

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE
Faculté de génie
Département de génie chimique et génie biotechnologique

UTILISATION DU LACTOSÉRUM DANS UN PROCÉDÉ DE CULTURE DE MICROALGUES MIXOTROPHES POUR LA PRODUCTION DE BIODIESEL

Thèse de doctorat
Spécialité : génie biotechnologique

Jean-Michel Bergeron Girard

Jury : Michèle Heitz (directrice)
Jean-Sébastien Deschênes (co-directeur)
Réjean Tremblay (co-directeur)
Nathalie Fauchaux (co-directrice)
J. Peter Jones (rapporteur)
Isabelle Marcotte (évaluatrice externe)
Joël Sirois (évaluateur interne)

À ma mère, à mon père, à ma sœur et à Maud qui cultivent avec moi la légèreté du quotidien

RÉSUMÉ

L'objectif général du présent travail est la conception et le développement d'un procédé original de culture de microalgues pour la production à grande échelle d'huiles végétales à faible coût pour le marché du biodiesel. Une procédure multicritères de sélection de souches a d'abord été mise au point afin d'identifier la souche la plus susceptible de répondre favorablement aux paramètres du procédé préalablement déterminés. Cette procédure permet d'inclure un grand nombre de critères et de considérer l'importance relative de chacun de ces critères dans le pointage final accordé aux souches présélectionnées. Elle peut aussi être transposée à d'autres contextes techniques et géographiques pour la sélection de souches destinées à diverses applications commerciales. Par la suite, l'évaluation de la croissance et de la productivité lipidique de la souche sélectionnée a été effectuée au laboratoire, en mode nutritionnel mixotrophe, en présence d'un important coproduit de l'industrie laitière : le perméat de lactosérum. Le profil lipidique de la souche privilégiée, ainsi que sa capacité à hydrolyser le lactose, mise au jour pour la première fois, ont permis de démontrer le potentiel du procédé. Une méthode de suivi de consommation et d'hydrolyse du lactose contenu dans le perméat de lactosérum a été développée par l'intermédiaire de la technologie « spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier » couplée à une sonde externe avec « prisme à réflectance totale atténuée » (FT-IR/ATR) ainsi que la conception de modèles univariés et multivariés de type « régression des moindres carrés partiels (PLS) ». Ce type de modèle est plus précis que ceux déjà existants pour le suivi des sucres dissous par la méthode infrarouge car l'utilisation de régressions PLS permet de tenir compte du phénomène d'additivité des spectres lorsque différents analytes pouvant absorber dans une même région du spectre sont présents dans la solution. De plus la méthode développée permet d'envisager un suivi *in situ* de la consommation des sucres dans une culture de microorganismes à l'échelle industrielle. La méthode des surfaces de réponse (RSM) a ensuite été utilisée afin d'optimiser les conditions de pH et de densité de biomasse permettant de provoquer une accumulation de lipides à l'intérieur de cultures de microalgues carencées en azote. Des modèles prédictifs ont été construits pour trois souches différentes et ce en modes nutritifs photoautotrophe et hétérotrophe. Ces travaux ont permis de démontrer l'existence d'une interaction entre ces deux facteurs. De plus, certaines différences spécifiques ont pu être mises en évidence en comparant les réponses entre les souches. À la lumière des résultats obtenus, certains paramètres d'optimisation devront être considérés dans le cadre d'un procédé de production de biomasse microalgale oléagineuse en deux phases; la première phase permettant d'obtenir une productivité en biomasse maximale par une stratégie d'augmentation du taux d'hydrolyse du lactose; la seconde phase permettant une accumulation de lipides grâce à l'imposition de conditions environnementales spécifiques. L'augmentation des connaissances disponibles sur les microalgues ainsi que l'amélioration et la standardisation des techniques de génie génétique nous permettront d'aborder ces problématiques d'un point de vue différent dans le futur.

Mots-clés : Microalgue, lipides, biodiesel, lactosérum, mixotrophie

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directeurs et directrices de recherche pour ce projet : Jean-Sébastien Deschênes, Réjean Tremblay, Michèle Heitz et Nathalie Fauchaux. Les autres personnes qui ont cordialement accepté de s'impliquer : Jonathan Gagnon, Claude Belzile, Iften Redjah, Jean-Bruno Nadalini, Bertrand Genard, Pierre St-Onge, Alexandre Boudreau, Thomas Poirier-Audet, Mhammed Ben Hafsa, Alain Caron, Andréane Tétrault et Marie-Laine Roy. Le Fond Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) pour le financement initial du projet, Ressources Aquatiques Québec (RAQ) et le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) pour l'aide financière fournie par l'intermédiaire du programme de formation orientée vers la nouveauté, la collaboration et l'expérience en recherche (FONCER). Je tiens aussi à remercier tous les membres de ma famille, mes amis et Maud pour le soutien indéfectible tout au long de cette belle aventure.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ACRONYMES ET ABRÉVIATIONS	xi
CHAPITRE 1 Introduction	1
1.1 Mise en contexte et problématique	1
1.2 Définition du projet de recherche	3
1.3 Objectifs du projet de recherche	4
1.4 Contributions originales	4
1.5 Plan du document	6
CHAPITRE 2 État de l'art	9
2.1 Sélection et amélioration de souches de microalgues	9
2.1.1 Sélection sur plusieurs générations	10
2.1.2 Modification génétique	10
2.1.3 Biologie synthétique	11
2.2 Systèmes de production de microalgues	11
2.2.1 PBRs tubulaires	13
2.2.2 PBRs colonnes	14
2.2.3 PBRs panneaux plats	15
2.2.4 Autres modèles de PBRs	15
2.3 Modes de nutrition	17
2.3.1 Photoautotrophie	17
2.3.2 Hétérotrophie	17
2.3.3 Mixotrophie	19
2.4 Bioraffinage	20
2.4.1 Lipides	20
2.4.2 Protéines	26
	iii

2.4.3	Hydrates de carbone	26
2.4.4	Applications commerciales de la biomasse microalgale entière	26
2.5	Biocarburants de troisième génération	28
2.5.1	Bioéthanol et biométhane	28
2.5.2	Biodiesel	28
2.5.3	Propriétés du biodiesel	29
2.6	Valorisation du lactosérum	32
2.6.1	Utilisation du lactose par les microalgues	33
CHAPITRE 3 Une approche multicritères de sélection de souches de microalgues pour la production de biodiesel et autres applications commerciales		35
Avant-propos		35
3.1	Introduction	39
3.2	Matériel and methods	41
3.3	Results and discussion	43
3.4	Conclusion	60
CHAPITRE 4 Culture mixotrophe de l'algue verte <i>Scenedesmus obliquus</i> en présence de perméat de lactosérum pour la production de biodiesel		61
Avant-propos		61
4.1	Introduction	65
4.2	Matériel and methods	67
4.3	Results and discussion	72
4.4	Conclusion	84
CHAPITRE 5 Modèles d'étalonnage FT-IR/ATR univarié et multivarié pour le suivi <i>in situ</i> des sucres dans un milieu complexe de culture de microalgues		85
Avant-propos		85
5.1	Introduction	89
5.2	Materials and methods	90
5.3	Results and discussion	94
5.4	Conclusion	101
CHAPITRE 6 Optimisation de l'accumulation de lipides neutres chez trois espèces de microalgues par la méthode des surfaces de réponse		102

Avant-propos	102
6.1 Introduction.....	106
6.2 Materiel and methods.....	107
6.3 Results and discussion	109
6.4 Conclusion	120
CHAPITRE 7 Commensalisme dirigé entre <i>Scenedesmus obliquus</i> et <i>Chlorella protothecoïdes</i> : vers la viabilité économique d'un procédé de culture de microalgues mixo/hétérotrophes pour le biodiesel	122
Avant-propos	122
7.1 Introduction.....	126
7.2 Material and methods.....	127
7.3 Results and discussion	131
7.4 Conclusion	137
CHAPITRE 8 Conclusion et perspectives	138
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	150
Annexe A.....	170
Annexe B.....	182

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 PBRs tubulaires.....	13
Figure 2.2 PBRs colonnes.....	14
Figure 2.3 PBR panneau plat.....	15
Figure 2.4 A. PBRs sacs verticaux. B. Concept de bio-façade.....	16
Figure 2.5 Paliers de détermination du profil lipidique d'un extrait lipidique total et exemples de méthodes analytiques de fractionnement.....	22
Figure 2.6 Représentation chimique de la réaction de transestérification.....	29
Figure 2.7 Structure moléculaire du lactose.....	33
 Figure 3.1 Triangular graph showing the proportions (%) of saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids in the total lipid pool of the 10 preselected strains.....	47
Figure 3.2 Triangular graph showing the proportions (%) of lipids, proteins and carbohydrates in the biomass of 7 of the 10 preselected strains after nitrogen starvation.....	49
 Figure 4.1 <i>S. obliquus</i> , <i>S. acutus</i> and <i>C. vulgaris</i> cultured in Bold's basal medium (BBM), and <i>C. protothecoides</i> cultured in BBM + 1 g L ⁻¹ soy protein peptone (BBMP), were supplemented with 5 g L ⁻¹ pure lactose under strict heterotrophic conditions (absence of light). Results are presented in cell concentration (x 10 ⁶) per mL and expressed as the mean±SD (n=3).....	73
Figure 4.2 (A.) Absorbance at 750 nm and dry weight (DW) of <i>S. obliquus</i> cultures grown in photoautotrophy, mixotrophy or heterotrophy. For mixotrophic and heterotrophic conditions, 40% (v/v) of the Bold's basal medium (BBM) was substituted by cheese whey permeate (WP). Results are expressed as the mean±SD (n=3). (B.) Correlation between absorbance at 750 nm and dry weight for cultures ≤ 2 g L ⁻¹ or > 2 g L ⁻¹ . Results are expressed as the mean±SD (n=3)......	75
Figure 4.3 Lactose, galactose, glucose (A.) and nitrogen (B.) concentrations in <i>S. obliquus</i> cultures grown under mixotrophic or heterotrophic conditions with 40% (v/v) cheese whey permeate (WP) substitution of the culture medium (BBM). Results are expressed as the mean±SD (n=3)......	78

Figure 4.4 Linear regression relating log neutral lipid (NL) cellular content in mg g ⁻¹ DW with log absorbance of cultures g ⁻¹ DW at 540 nm (A.), 680 nm (B.), 750 nm (C.) and 680 nm – 750 nm (D.).	84
Figure 5.1 Calibration curves of aqueous solutions made from pure lactose, glucose and galactose in the concentration range 5 – 70 g L ⁻¹ .	94
Figure 5.2 Mid-infrared absorbance spectra (A) and sugar concentration in the culture media over 7 days (univariate model estimation from spectra acquired in presence (before centrifuge) or in absence (after centrifuge) of the cells) as well as total dissolved solids content and biomass density as measured gravimetrically (B).	95
Figure 5.3 Gas chromatogram (A) and proportions of each sugar present in the complex culture medium (B) from days 0 to 13 as measured by the reference procedure (GC-MS).	97
Figure 6.1 3D response-surface graphs of the six RSM experiments showing the interactive effect of pH and biomass density on mean cell fluorescence (FL2 mean) for <i>Scenedesmus obliquus</i> (SO), <i>Ankistrodesmus convolutus</i> (AC) and <i>Chlorella protothecoides</i> (CP).	116
Figure 6.2 Photoautotrophic (A20) and heterotrophic (H20) cultures of <i>C. protothecoides</i> at the end of the RSM experiments.	118
Figure 6.3 Nile red coloration of the three mixotrophic strains after the lipid accumulation stage.	119
Figure 7.1 Experimental design of the H ₂ O ₂ /catalase and co-culture experiments.	129
Figure 7.2 Experimental design of the sequential culture experiments.	130
Figure 7.3 Absorbance at 750 nm of <i>S. obliquus</i> cultures after H ₂ O ₂ /catalase (cat.) treatment vs non-contaminated control cultures. Results are expressed as the mean±SD (n=3). Different letters indicate significant difference (p < 0.001).	132
Figure 7.4 Proportion (%) of lactose, glucose and galactose present in the culture medium of <i>S. obliquus</i> cultivated alone (A) or in co-culture with <i>C. protothecoides</i> (B). Results are expressed as the mean±SD (n=3). Different letters indicate significant difference in sugar concentration (p < 0.05).	133

Figure 7.5 Phase contrast microscopy of homogeneous (<i>S. obliquus</i>) or heterogeneous (<i>S.obliquus</i> + <i>C. protothecoides</i>) microalgal cultures. Red arrows point at <i>C. protothecoides</i> cells characterized by larger and round cells.	134
Figure 7.6 Residual lactose present in the culture medium at the end of the 5 sequential culture experiments. Results are expressed as the mean±SD (n=3). Different letters indicate significant difference in sugar concentration ($p < 0.001$).	136
Figure 8.1 Schéma du procédé de production de microalgues mixotrophes par l'utilisation du perméat de lactosérum.....	140

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Exemples de produits commerciaux à base de lipides et de pigments de micro-algues.....	23
Tableau 2.2 Exemples de compagnies qui travaillent à commercialiser des biocarburants à base de microalgues.....	25
Table 3.1 Upstream determination of critical process parameters.....	43
Table 3.2 List of pre-selected strains.	44
Table 3.3 Detailed description of scores attribution for each selected set of indicators of the six selection criteria.	45
Table 3.4 Experimental determination of culture parameters used to determine lipid and triglycerides (TAG) productivity of the 10 pre-selected strains. (DCW = Dry cells weight) ...	51
Table 3.5 Key morphological and physiological cell characteristics of the preselected strains.	53
Table 3.6 Diversity of industrial wastewaters and affordable residual matters that can serve as DOC source for growth.	56
Table 3.7 Scores attributed to each preselected strains for each indicators of the six selection criteria.....	57
Table 3.8 Relative importance of each criterion.....	59
Table 3.9 Final scores and classification.	59
Table 4.1 Chemical characteristics of solutions used as medium broth. All values are means±SD (n=3).....	68
Table 4.2 Biomass yields at day 7 and day 13, and lipid productivity at day 13 of <i>S. obliquus</i> cultured in Bold's basal medium (BBM), BBM + 40% (v/v) whey permeate (WP) or lake water (LW) + 40% (v/v) whey permeate.....	80
Table 4.3 Total and neutral lipid fatty acid composition at day 7 and day 13 of <i>S. obliquus</i> cultures in BBM, BBM + 40% (v/v) whey permeate and lake water + 40% (v/v) whey permeate ^A	82

Table 5.1 Composition of the 46 aqueous solutions used to build the multivariate model. Total sugar concentration was kept constant at 100 g L ⁻¹	91
Table 5.2 Summary of the main calibration and prediction parameters of the PLS regression developed for the determination of lactose, glucose and galactose. Proportions are expressed in % of total in a solution containing 100 g L ⁻¹ sugar.	98
Table 5.3 Comparative results of the proportion of each sugar present in the culture medium as estimated by the multivariate model and the gas chromatographic method (GC-MS) at days 0, 7 and 13 of the experiment.	100
 Table 6.1 Mixotrophic media and biomass production in PBR.	110
Table 6.2 Coded levels for independent factors of the Central Composite Design (CCD). <i>S. obliquus</i> (SO), <i>A. convolutus</i> (AC), <i>C. protothecoides</i> (CP).	111
Table 6.3 Central Composite Design (CCD) of experiments	111
Table 6.4 Equations and summary of the main “analysis of variance (ANOVA)” results of the six RSM models. Raw data was Log ₁₀ transformed. (SO = <i>S. obliquus</i> ; AC = <i>A. convolutus</i> ; CP = <i>C. protothecoides</i> ; Auto = photoautotrophy; Hetero = heterotrophy; Df = degree of freedom; SS = sum of squares).	113
Table 6.5 Parameters dictated by each of the RSM models in order to maximize NL accumulation.	115
 Table 7.1 Biomass yields of the sequential experiment. Different letters indicate significant difference in biomass yield ($p < 0.05$) for each stage and the total. ND = not determined. ...	135
Table 7.2 Analysis of variance (ANOVA) of the biomass yields of the sequential experiment.	135

LISTE DES ACRONYMES ET ABRÉVIATIONS

Acronyme	Définition
AA	Arachidonic Acid
ANOVA	Analysis of Variance
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
BBM	Bold's Basal Medium
BBMP	Bold's Basal Medium + Pepton
CCD	Central Composite Design
CCMP	National Center for Marine Algae and Microbiota
CFPP	Cold filter plugging point
CPCC	Canadian Phycological Culture Center
DOC	Dissolved Organic Carbon
DHA	Docosahexaenoic Acid
DSC	Dissolved Solids Content
DW	Dry Weight
EAAI	Essential Amino Acid Index
EN	European Standard
EMP	Embden-Meyerhof Pathway
EPA	Eicosapentaenoic Acid
FA	Fatty Acid
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
FT-IR/ATR	Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance
GC	Gas Chromatography
HNA	High Nucleic Acid
HTL	Hydrothermal Liquefaction
IEA	International Energy Agency
LC	Liquid Chromatography

LNA	Low Nucleic Acid
LW	Lake Water
MS	Mass Spectrometry
MSSP	microalgae strain selection procedure
MUFA	Monounsaturated Fatty Acid
NL	Neutral Lipid
PBR	Photobioreactor
PLS	Partial Least Square
PPP	Pentose Phosphate Pathway
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
RD	Relative Deviation
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation
RPD	Residual Prediction Deviation
RSM	Response Surface Methodology
ROS	Reactive Oxygen Species
SFA	Saturated Fatty Acid
SFE	Supercritical Fluid Extraction
SNK	Student-Newman-Keuls
TAG	Triglycerides
TCA	Tricarboxylic acid cycle
TL	Total Lipids
UTEX	University of Texas at Austin
UTR	Untranslated Region
VN	Vector Normalization.
WP	Whey Permeate

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte et problématique

La production de biocarburants est en plein essor à travers le monde car elle représente une alternative à la consommation des combustibles fossiles traditionnels, tels le charbon et le pétrole, dans un contexte social où la croissance s'oriente vers le développement durable de nos ressources. Le biodiesel produit à partir d'une source biologique est défini comme un carburant renouvelable pouvant être utilisé dans les moteurs à combustion conventionnels et il pourrait représenter plus de 25% des besoins mondiaux en carburants à l'horizon 2050 (IEA, 2011). Ceci permettrait de réduire de 2,1 milliards de tonnes les émissions de CO₂ reliées au secteur des transports et aussi, de diminuer de façon considérable la dépendance de cette industrie au pétrole (IEA, 2011). Le biodiesel est actuellement principalement produit à partir d'huiles végétales (soya, canola, etc...) et animales dont la disponibilité est limitée par la productivité des cultures et l'utilisation de ces huiles dans l'alimentation humaine. Il s'avère donc nécessaire de développer d'autres sources d'approvisionnement en huiles pour répondre à la demande croissante en biodiesel, tout en considérant les aspects économiques et les impacts sociaux de cette industrie émergente (Serra & Zilberman, 2013).

La forte teneur en lipides neutres de la classe des triglycérides (TAGs) de certaines espèces de microalgues pourrait devenir une source de biodiesel intéressante (Chisti, 2007). Les microalgues sont des organismes unicellulaires photosynthétiques à la base de toute la chaîne alimentaire aquatique qui peuvent dans certaines conditions présenter une productivité de biomasse à l'hectare 30 fois supérieure à celle des plantes oléagineuses terrestres (Williams & Laurens, 2010). Certaines espèces ont la particularité de pouvoir accumuler de grandes quantités de lipides, particulièrement sous forme de TAG, pouvant parfois représenter 80% de leur masse sèche (Chisti, 2007). Les TAGs peuvent être transformés en biodiesel par une réaction appelée transestérification. La communauté

scientifique, encouragée par l'opinion populaire, les gouvernements et mêmes certaines pétrolières, travaille actuellement à développer un procédé industriel de culture de masse de microalgues pour la production de biodiesel. Le défi consiste à trouver une combinaison entre espèce de microalgues, conditions de culture, valorisation des coproduits et méthode d'extraction et de transformation des acides gras en biodiesel, qui permettra de rendre ce biocarburant sur le marché à un prix compétitif.

Il existe entre 200 000 et plusieurs millions d'espèces de microalgues, dont à peine 10% sont connues et caractérisées (Cadoret & Bernard, 2008). Du côté de la sélection d'espèces marines pour la production de biodiesel, des efforts colossaux ont déjà été réalisés entre autres par le « National Renewable Energy Laboratory » Colorado, États-Unis. Le « Aquatic Species Program » a permis d'obtenir de l'information sur plus de 3000 espèces de microalgues et a ouvert la voie à un grand nombre d'avancées scientifiques sur le plan de la physiologie, la biochimie et les manipulations génétiques. Une des principales conclusions du rapport final était l'impossibilité de rendre compétitif le prix des carburants fossiles traditionnels de l'époque (Sheehan et al., 1998). L'augmentation du prix du baril de pétrole, qui en septembre 2013 dépassait les 110\$, et l'épuisement éventuel et inévitable des ressources mondiales de pétrole, ont récemment fait resurgir l'idée d'un biodiesel microalgal. Plusieurs groupes de recherche travaillent actuellement à isoler et caractériser de nouvelles espèces de microalgues possédant les caractéristiques désirées pour la production de biodiesel (Abou-Shanab et al., 2011; Li et al., 2008; Park et al., 2012; Pereira et al., 2011). Les principales caractéristiques recherchées sont principalement une productivité lipidique élevée et un profil lipidique composé majoritairement de TAGs avec des acides gras constitués de 16 à 20 atomes de carbone, saturés ou mono-insaturés. Généralement, les espèces de microalgues marines présentent un profil lipidique composé d'une plus grande proportion d'acides gras polyinsaturés à très longues chaînes de carbone (plus de 20 atomes de carbone) que les espèces d'eau douce.

Le mode de nutrition représente une variable intéressante dans l'élaboration d'un procédé de culture de microalgues. En effet, l'hétérotrophie et la mixotrophie, qui impliquent

l'assimilation d'une source de carbone organique dissous (DOC), peuvent être exploités par certaines espèces et ont montré des taux de productivité de 10 à 100 fois supérieurs à ceux obtenus en photoautotrophie ainsi qu'un enrichissement en lipides dans certains cas particuliers (Perez-Garcia et al., 2010). Plusieurs contraintes sont toutefois à considérer lors de la culture de microalgues en modes mixotrophe et hétérotrophe, dont le risque élevé de contamination par d'autres microorganismes et les coûts engendrés par l'utilisation d'une source de carbone organique dissous (DOC). Ces coûts dépendent de la source de DOC choisie justifiant l'utilisation d'eaux usées ou de matières résiduelles industrielles sélectionnées (Andrade & Costa, 2006; Barrocal et al., 2010; Bhatnagar et al., 2010; Garci et al., 2000).

1.2 Définition du projet de recherche

Le présent projet s'inscrit dans un contexte où la recherche dans le domaine du biodiesel microalgal est orientée vers la réduction des coûts de production à l'échelle industrielle. En ce sens, un nouveau procédé de culture de microalgues exploitant les modes nutritifs mixotrophe et hétérotrophe a été élaboré en tenant compte du contexte géographique, technique et socioéconomique canadien. Divers paramètres du procédé ont d'abord été testés et optimisés à l'échelle laboratoire dans des volumes de culture de moins d'un litre, puis des essais ont été effectués à l'échelle pilote en photobioréacteurs (PBR) de 27 litres. La culture en PBR présente de nombreux avantages comparativement à la culture en étangs et ce, particulièrement à des latitudes situés au nord du 45^{ième} parallèle. Elle permet généralement un meilleur contrôle des conditions de culture, des échanges gazeux, de la température et des risques de contamination par d'autres microorganismes (Jorquera et al., 2010).

Le choix d'une source de DOC pour l'élaboration du procédé s'est arrêté sur le lactosérum. Cette matière résiduelle de l'industrie du fromage, très riche en lactose, est disponible en grande quantité et à faible coût partout à travers le globe. Les travaux ont été orientés plus particulièrement vers la valorisation du perméat de lactosérum, un dérivé déprotéiné du lactosérum brut.

1.3 Objectifs du projet de recherche

Objectif général : Élaborer et développer des stratégies de réduction des coûts de production d'une biomasse microalgale oléagineuse pour l'industrie du biodiesel.

Objectif spécifique #1 : Sélectionner, parmi toutes les souches de microalgues disponibles dans les collections de culture canadiennes et américaines, une souche adaptée au procédé de culture ciblé dans le contexte géographique, technique et socioéconomique canadien.

Objectif spécifique #2 : Optimiser les conditions de croissance de la souche de microalgue sélectionnée dans un milieu de culture composé de perméat de lactosérum.

Objectif spécifique #3 : Optimiser la productivité lipidique de la souche de microalgue sélectionnée.

1.4 Contributions originales

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit apportent des contributions scientifiques originales dans les domaines de la sélection de souches de microorganismes pour une production à visées commerciales, de la culture de microorganisme en mode nutritif mixo/hétérotrophe à portée industrielle, de l'optimisation des conditions d'accumulation de lipides neutres dans les microalgues et des avenues de valorisation du lactosérum.

Sur le plan de la sélection de souches de microorganismes pour des applications commerciales, une procédure originale permettant de considérer 6 critères de sélection et 12 indicateurs a été développée. Cette procédure permet également de considérer l'importance relative de chacun des critères grâce à une adaptation de la méthode d'Ulrich, une méthode fréquemment utilisée dans le domaine du design industriel pour la sélection de concept.

Sur le plan de la culture de microorganismes mixo/hétérotrophes, l'intérêt de la culture mixotrophe pour l'optimisation du taux de croissance et de la productivité de biomasse de l'algue verte *Scenedesmus obliquus* a été mis en lumière. Les travaux ont également permis de démontrer la capacité d'espèces de microalgues appartenant au genre *Scenedesmus* à utiliser le disaccharide lactose pour croître en hétérotrophie stricte, contrairement à des espèces appartenant au genre *Chlorella*. De plus, une nouvelle méthode de suivi des sucres dans un milieu de culture de microorganismes a été développée. Cette méthode basée sur le spectre d'absorbance infrarouge du milieu permet de considérer le phénomène « d'additivité des spectres », une amélioration considérable comparativement aux modèles existants.

Sur le plan de l'optimisation des conditions d'accumulation de lipides neutres cellulaires, la comparaison entre trois espèces de microalgues a permis de tirer des conclusions notables. En effet, la méthode des surfaces de réponse (RSM) a permis d'observer un effet interactif entre le pH et la densité de biomasse sur l'accumulation de lipides neutres chez les microalgues et des différences spécifiques ont été observées entre l'espèce *Chlorella protothecoïdes* appartenant à la classe des *Trebouxiophycea* et les espèces *Scenedesmus obliquus* et *Ankistrodesmus convolutus* appartenant à la classe des *Chlorophyceae*.

Finalement, nous suggérons l'utilisation d'un mode de culture commensale pour optimiser la productivité des cultures de microalgues ainsi que l'utilisation du DOC contenu dans le perméat de lactosérum.

Globalement, ces travaux exposent pour la première fois la possibilité d'utiliser le perméat de lactosérum comme source de nutriments et de DOC pour la culture de microalgues à l'échelle industrielle sans hydrolyse artificielle préalable du lactose et ainsi de valoriser cet important coproduit de l'industrie fromagère par sa conversion directe en biomasse pour le marché du biodiesel et/ou d'autres produits d'intérêt commerciaux à base de microalgues.

1.5 Plan du document

Ce manuscrit est présenté sous la forme d'une thèse par articles composée de cinq articles scientifiques. Il comprend sept chapitres, les conclusions et perspectives des travaux de recherche ainsi qu'une annexe, dont le détail est donné ci-dessous :

✓ *Chapitre 1 : Introduction*

Ce chapitre présente une mise en contexte et problématique, la définition et les objectifs du projet de recherche, un résumé des contributions originales ainsi que le plan du document.

✓ *Chapitre 2 : État de l'art*

Ce chapitre se veut une revue des connaissances existantes en ce qui a trait à la sélection et l'amélioration de souches de microalgues, aux systèmes de production, aux modes nutritifs ainsi qu'aux domaines d'exploitation et d'application des microalgues. Nous présentons également des aspects spécifiques au projet et servant de fil conducteur à nos travaux, tels que l'influence de la qualité des huiles végétales sur les propriétés physicochimiques du biodiesel ainsi que les avenues existantes et potentielles de la valorisation du lactosérum.

✓ *Chapitre 3 : Une approche multicritères de sélection de souches de microalgues pour la production de biodiesel et autres applications commerciales*

Ce chapitre est consacré à la présentation d'une nouvelle méthode multicritères de sélection de souches de microalgues pour des applications commerciales appliquée aux spécificités de la présente étude. Le choix des souches d'algues adaptées pour mener à bien nos recherches y est justifié.

✓ *Chapitre 4 : Culture mixotrophe de l'algue verte *Scenedesmus obliquus* en présence de perméat de lactosérum pour la production de biodiesel*

Ce chapitre présente les résultats obtenus à l'échelle laboratoire pour la culture de *Scenedesmus obliquus* en présence de perméat de lactosérum. Plusieurs paramètres

d'optimisation du procédé tenant compte de facteurs de mise à l'échelle y sont proposés. Les méthodes de suivi de croissance telles que l'absorbance des cultures à différentes longueurs d'onde, les mesures de rendement de biomasse sèche et le compte cellulaire, ainsi qu'une nouvelle méthode d'estimation du contenu lipidique cellulaire sont également présentées.

✓ *Chapitre 5 : Modèles d'étalonnage FT-IR/ATR univarié et multivarié pour le suivi in situ des sucres dans un milieu complexe de culture de microalgues*

Ce chapitre propose l'utilisation d'une nouvelle technologie pour le suivi *in situ*, quantitatif et qualitatif des sucres présents dans un milieu de culture microbiologique complexe. La méthode a été appliquée à des cultures de microalgues en présence de perméat de lactosérum et fait intervenir des mesures d'absorbance du milieu à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier couplé à une sonde externe avec prisme à réflectance totale atténuée (FT-IR/ATR) ainsi que la conception de modèles multivariés de type « régression des moindres carrés partiels (PLS) »

✓ *Chapitre 6 : Optimisation de l'accumulation de lipides neutres chez trois espèces de microalgues par la méthode des surfaces de réponses*

Ce chapitre introduit une stratégie expérimentale pour l'optimisation des conditions de cultures permettant une induction rapide et efficace de l'accumulation de lipides neutres chez les microalgues. L'utilisation de la méthode des surfaces de réponse (RSM) permet de comparer la réponse de trois espèces de microalgues à différentes conditions de pH, de densité cellulaire et de temps d'incubation lorsque carencées en azote, et ce, en modes nutritionnels photoautotrophe et hétérotrophe.

✓ *Chapitre 7 : Commensalisme dirigé entre *Scenedesmus obliquus* et *Chlorella protothecoides* : vers la viabilité économique d'un procédé de culture de microalgues mixo/hétérotrophes pour le biodiesel.*

Ce chapitre présente une méthode de stérilisation des milieux de culture utilisant le peroxyde d'hydrogène, ainsi qu'une stratégie de culture séquentielle des espèces *Scenedesmus obliquus* et *Chlorella protothecoides* permettant d'améliorer le rendement

des cultures ainsi que l'efficacité du procédé de phycoremédiation du perméat de lactosérum présenté précédemment.

✓ *Conclusions et perspectives*

Cette partie permet de tirer un bilan global des différents travaux réalisés dans le cadre de cette thèse. De même, des perspectives de recherche sont proposées dans la continuité des travaux, en particulier au niveau de l'application des stratégies d'optimisation du procédé.

✓ *Annexe*

Ce manuscrit comporte une annexe présentant une liste de plus de 100 espèces de microalgues recensées à partir de la littérature du biodiesel, principalement les articles de revue depuis les cinq dernières années.

CHAPITRE 2 ÉTAT DE L'ART

2.1 Sélection et amélioration de souches de microalgues

La sélection et l'amélioration de souches est à la base du développement de tout procédé de production de microalgues. Concernant la sélection de souches pour la production de biodiesel et autres métabolites à valeur commerciale, deux principales tendances sont actuellement observées dans la littérature scientifique. L'une repose sur les travaux d'isolation et de caractérisation de souches provenant des milieux aquatiques marin et d'eau douce (Abou-Shanab et al., 2011; Park et al., 2012; Pereira et al., 2011), ou de souches vivant dans des conditions environnementales extrêmes (Bernard, 2010). Ces travaux permettent d'augmenter notre connaissance sur l'impressionnante biodiversité des microalgues. Le nombre d'espèces de microalgues existantes est estimé à entre 200 000 et un million, dont à peine 10% sont caractérisées (Cadoret & Bernard, 2008).

L'autre tendance implique d'importants travaux d'ingénierie génétique afin de sélectionner sur plusieurs générations, d'améliorer et même créer de nouvelles souches de microalgues à partir de celles déjà connues (Georgianna & Mayfield, 2012). Ces manipulations génétiques ont généralement comme objectif le développement de souches de microalgues performantes utilisées comme manufactures de composés précis tels que des lipides spécialisés, des protéines d'intérêt biopharmaceutique, ou d'autres molécules à valeur commerciale. Les méthodes actuellement utilisées pour l'amélioration génétique des microalgues peuvent être séparées en trois grandes catégories : 1- la sélection sur plusieurs générations d'individus possédant les traits phénotypiques désirés, 2- les méthodes conventionnelles de modification génétique et 3- la biologie synthétique.

2.1.1 Sélection sur plusieurs générations

Quoique le temps de génération des microalgues soit relativement court comparativement aux végétaux terrestres agricoles, le manque de connaissances des modes de reproduction sexuée de plusieurs espèces limite le potentiel de ce type d'amélioration génétique. Diverses méthodes permettant d'accélérer les taux de mutations des microorganismes (traitement physique ou chimique tels les rayons ultraviolets ou la methylnitronitrosoguanidine) peuvent être utilisées afin d'augmenter l'incidence d'individus possédant des phénotypes désirables à l'intérieur d'une population de microalgues (Iskandarov et al., 2011). D'autres méthodes basées sur le tri cellulaire par cytométrie de flux, peuvent ensuite être utilisées afin de sélectionner et d'isoler efficacement ces individus de la culture initiale (Bougaran et al., 2012).

2.1.2 Modification génétique

La modification génétique de microalgues est de plus en plus courante et pour certaines espèces d'intérêt commercial telles que *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis gaditana*, et *Scenedesmus obliquus*, des méthodes de transformation optimisées sont disponibles dans la littérature (Cha et al., 2012; Guo et al., 2013; Kindle, 1990; Radakovits et al., 2012; Zaslavskaja et al., 2000). Pour la modification génétique des algues, certains facteurs doivent être obligatoirement considérés tels que la particularité du code génétique microalgal, le choix de séquences promotrices permettant une expression optimale du transgène ainsi que le design de séquences correspondant à des régions non-traduites des ARN messagers qui permettent de tromper les mécanismes cellulaires de régulation négative (Gimpel et al., 2013). Dans la plupart des cas, ces manipulations visent à introduire un gène codant pour une protéine qui présente une activité d'intérêt biopharmaceutique, ou encore une enzyme intervenant dans la voie de biosynthèse d'un composé afin de moduler sa productivité ou sa qualité. Les méthodes les plus fréquemment utilisées pour l'introduction du transgène à l'intérieur des cellules sont l'électroporation et la transfection de gènes par l'intermédiaire de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, mais d'autres techniques, telles

que le bombardement particulaire et la méthode des billes de verre, ont aussi montré un certain potentiel (Kirchmayr & Griesbeck, 2012).C

2.1.3 Biologie synthétique

En 2010, avec leurs travaux sur la bactérie *Mycoplasma mycoides* publiés dans le journal scientifique « Science », l'équipe de Craig J. Venter a franchi plusieurs obstacles techniques inhérents à l'avancement de la biologie synthétique (Gibson et al., 2010). Vu par certains comme une extension de la chimie de synthèse, la synthèse et l'assemblage *de novo* d'un génome complet démontre la précision et l'efficacité des appareils modernes de séquençage et de synthèse d'ADN. Cette nouvelle méthode d'ingénierie génétique pave non seulement la voie à la création de microorganismes spécialisés pour la synthèse de composés à valeur commerciale, entre autres dans les domaines bioénergétique et biopharmaceutique, mais soulève également plusieurs questions d'ordre social, environnemental, philosophique et éthique, entre autres dans les domaines de la propriété intellectuelle et de la brevetabilité du vivant. Déjà, la biologie synthétique se tourne vers de potentielles applications chez les microalgues (Georgianna & Mayfield, 2012; Gimpel et al., 2013).

2.2 Systèmes de production de microalgues

La production de microalgues en étangs de type « raceway » existe depuis les années 1950 et est la plus répandue. Ce type de système est une boucle fermée qui exploite un bassin de forme ovale de 0,2 à 0,5 m de profond avec brassage automatique effectué par une roue agitatrice. Il peut être installé dans des secteurs impropres à l'agriculture et est parfois considéré comme une méthode plus économique de production de microalgues à grande échelle par rapport aux photobioréacteurs (PBRs) en raison de ses faibles coûts de production et d'opération. Toutefois, la productivité de biomasse est faible comparativement au PBRs souvent dû à un brassage inefficace (Chisti, 2007). En 2008, le coût de production de *Dunaliella salina* en étang, une espèce cultivée pour la production de caroténoïdes, était de d'environ 4 \$ / kg de masse sèche (Brennan & Owende, 2010).

De tels systèmes doivent être constamment alimentés en eau en raison de la perte par évaporation et sont soumis à des risques élevés de contamination par d'autres microorganismes. De plus, un système ouvert est nécessairement soumis aux conditions climatiques locales et ne peut être envisageable dans les régions plus nordiques (Harun et al., 2010).

Les PBRs offrent un contrôle des conditions de culture et des risques de contamination beaucoup plus étroit que les étangs. Ils permettent ainsi une meilleure productivité pouvant atteindre $47 \text{ g m}^{-2} \text{ jour}^{-1}$ comparativement à $10 \text{ m}^{-2} \text{ jour}^{-1}$ pour les étangs de type « raceway » (Greenwell et al., 2010; Schenk et al., 2008). Les coûts plus élevés de construction de telles structures sont donc compensés par un taux de productivité 5 fois plus élevé (Chisti, 2007). Il existe différents types de PBRs qui peuvent être opérés en mode « batch », continu ou semi-continu, et la recherche se poursuit afin de développer de nouveaux systèmes permettant une production à grande échelle (Chen *et al.*, 2011).

Trois des principaux facteurs à considérer lors du choix d'un PBR sont les échanges gazeux, le brassage et le pH. En effet, de tels systèmes peuvent voir la concentration en oxygène dissous augmenter dû à la production par les algues en mode autotrophe alors que le pH augmente par la diminution de la concentration de CO_2 dissous. De plus, le brassage doit être assuré afin d'éviter la sédimentation des microalgues. Ces variables peuvent être contrôlées par le bullage d'un mélange généralement de 20% (V/V) de CO_2 et 80% (V/V) d'air. Un bullage continu permet de brasser les cultures tout en assurant un apport constant en CO_2 , qui permet de contrôler le pH, et un dégazage de l'eau, ce qui évite d'atteindre des concentrations d'oxygène dissous nocives pour les microalgues. L'accumulation d'oxygène dissous à des valeurs supérieures à la saturation par l'air entraîne une inhibition de la photosynthèse et l'apparition de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Ces ROS ont des effets délétères sur le métabolisme et la survie des cellules. Pour ces raisons, la concentration d'oxygène dissous ne devrait jamais dépasser 400% de la valeur de saturation par l'air (Chisti, 2007).

Un système hybride combinant les deux modes de cultures (PBRs et étangs) est aussi envisageable (Schenk et al., 2008). Dans ce type de système, les cultures microalgales entretenues dans des PBRs, dans des conditions axéniques et optimales pour leur croissance, servent à ensemençer des étangs qui eux permettent une production de masse à moindres coûts. Ce procédé est actuellement utilisé par Aquasearch (Hawaii, USA) pour cultiver l'espèce *Haematococcus pluvialis* pour la production d'astaxanthine, un puissant antioxydant pouvant servir de suppléments alimentaires humain et animal.

2.2.1 PBRs tubulaires

Approprié pour la culture extérieure, ce système permet d'optimiser la surface exposée à la lumière (figure 2.1). Les cultures microalgales sont pompées à travers de longs tubes transparents. Qu'ils soient horizontaux, verticaux, inclinés ou en hélice, la configuration dépend des spécifications du système et de l'espèce cultivée. Les systèmes verticaux offrent un meilleur transfert de masse et une économie d'énergie par rapport aux systèmes horizontaux, qui eux sont plus envisageables à grande échelle mais qui requièrent une plus grande superficie (Harun et al., 2010). L'usine de 700 m³ de Klötze en Allemagne utilise la technologie des PBRs verticaux.

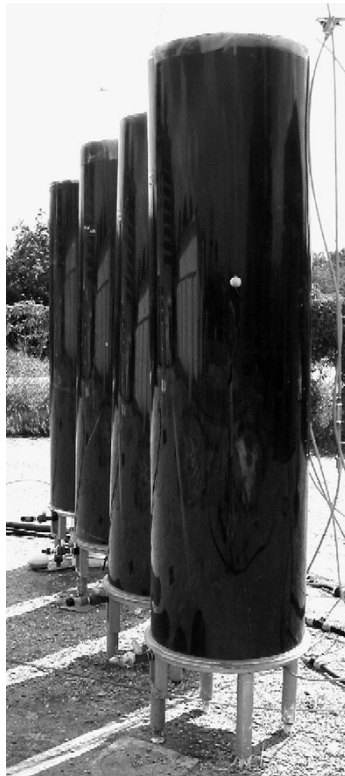


(photo tirée de Greenwell *et al.*, 2009)

Figure 2.1 PBRs tubulaires.

2.2.2 PBRs colonnes

Les PBRs colonnes (figure 2.2) peuvent être brassées mécaniquement mais plus souvent par bullage. Les colonnes sont placées verticalement, aérées par le bas et éclairées à travers leurs parois transparentes. Elles présentent plusieurs avantages dont un contrôle accru des conditions de culture, un brassage efficace et un taux de transfert gazeux supérieur. En effet, la capacité de relargage de l'oxygène d'un PBR est gouvernée par son coefficient de transfert de masse gaz-liquide. Ce coefficient est en général plus élevé dans les colonnes que dans les réacteurs tubulaires. Plusieurs PBRs expérimentaux se présentent sous cette forme et ces systèmes peuvent être envisagés pour la culture de masse entre autres à cause de l'optimisation de l'utilisation des superficies, qu'ils offrent (Zittelli et al., 2006).



(photo tirée de Zittelli *et al.*, 2006)

Figure 2.2 PBRs colonnes.

2.2.3 PBRs panneaux plats

Ce type de PBR est reconnu pour supporter les meilleures productivités de biomasse microalgales (figure 2.3). Par exemple, Zhang *et al.*, ont obtenu un rendement de productivité de $30 \text{ g m}^{-2} \text{ jour}^{-1}$ avec un PBR panneau plat en culture extérieure (Zhang *et al.*, 2001). Comparativement aux autres types de PBRs, ce système présente les avantages d'une plus faible consommation d'énergie, une meilleure capacité de transfert de masse, un excellent contrôle de la concentration d'oxygène dissous et une meilleure efficacité photosynthétique (Harun *et al.*, 2010). Une usine exploitant cette technologie a été construite en 2008 à Hambourg en Allemagne.



(photo prise au laboratoire de la station aquicole de Pointe-aux-Pères, Qc en 2010)

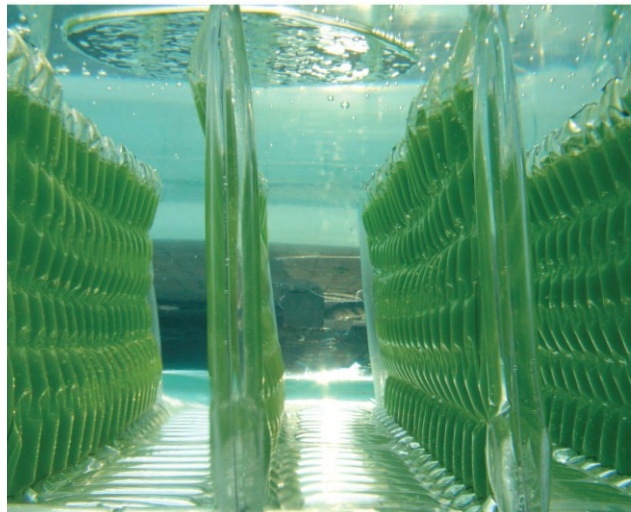
Figure 2.3 PBR panneau plat.

2.2.4 Autres modèles de PBRs

Plusieurs autres modèles de PBRs sont également en cours de développement. Notamment, des systèmes exploitant la répétition d'unités confinées en sacs verticaux

(figure 2.4-A) et des systèmes éclairés de l'intérieur (Eriksen, 2008; Wijffels & Barbosa, 2010). Aussi, la compagnie française « Ennesys » travaille actuellement au développement de systèmes exploitant le concept des bio-façades ou murs de microalgues (figure 2.4-B).

A.



(photo tirée de Wijffels et Barbosa, 2010)

B.



(images tirées de www.ennesys.com)

Figure 2.4 A. PBRs sacs verticaux. B. Concept de bio-façade.

2.3 Modes de nutrition

Le mode de nutrition est défini par la façon avec laquelle un organisme se procure le carbone nécessaire à sa survie et sa croissance. Certaines espèces de microalgues ont la capacité d'assimiler diverses sources de DOC par les mécanismes de la respiration cellulaire en plus du carbone inorganique, présent dans l'eau sous la forme de CO_2 , par la photosynthèse. Le DOC assimilé par les microalgues peut être de différentes formes (glucose, glycérol, acétate de sodium, etc...) selon l'espèce (Ceron-Garcia et al., 2000).

2.3.1 Photoautotrophie

La photoautotrophie est le mode de nutrition par lequel les microalgues assimilent le carbone inorganique sous forme de CO_2 . L'énergie nécessaire à cette assimilation est fournie par la lumière, processus appelé photosynthèse (Taiz & Zeiger, 2010). Dans une optique de production de biomasse, dans les cultures traditionnelles photoautotrophes, l'élément limitant la croissance des populations est souvent la pénétration de la lumière dû à l'ombrage mutuel (Richmond, 2007). Ce phénomène est provoqué par l'augmentation de l'ombrage des cellules les unes sur les autres à mesure que la densité cellulaire devient plus élevée.

2.3.2 Hétérotrophie

L'hétérotrophie est le mode de nutrition par lequel les microalgues assimilent le DOC. En l'absence de lumière, l'énergie requise pour la croissance est fournie par l'oxydation du substrat organique, phénomène appelé chemo-hétérotrophie. Certaines espèces de microalgues utilisent l'énergie de la lumière pour assimiler le DOC, processus appelé photo-hétérotrophie (Chen et al., 2011; Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004). Plusieurs facteurs sont à considérer lors de la mise en culture de microalgues en mode hétérotrophe pour la production de biomasse :

- 1- toutes les espèces ne sont pas hétérotrophes

- 2- l'augmentation des coûts liés à l'utilisation d'un substrat organique et à la stérilisation du matériel
- 3- les risques de contamination par d'autres microorganismes
- 4- l'inhibition de la croissance par l'excès de substrat organique
- 5- l'incapacité à produire certains métabolites induits uniquement en présence de lumière, tels les pigments photosynthétiques ou autres.

Les cellules microalgales capables de croître en conditions hétérotrophes modifient leur profil d'expression génique en réponse à la disponibilité de différents substrats carbonés et à la disponibilité de la lumière. En effet, il a été démontré que des gènes codant pour plusieurs enzymes, impliquées entre autres dans le métabolisme du carbone, subissaient des changements de niveaux d'expression lors de l'ajout dans le milieu de culture d'une source de DOC tels le glucose et/ou l'absence de lumière (Perez-Garcia et al., 2011b). Cette réponse est liée au changement de métabolisme de la photosynthèse vers la respiration cellulaire. Dans un sens large, tous les organismes, incluant les microalgues, utilisent les mêmes voies métaboliques pour la respiration cellulaire. Pendant la respiration, l'oxygène et le DOC sont consommés et l'énergie sous forme d'ATP et de NADH est produite avec le CO₂. Des nombreuses voies utilisées par les microorganismes pour la glycolyse aérobie, seules deux - le Embden-Meyerhof (EMP) et la voie des pentoses-phosphates (PPP) - ont été mises en évidence chez les algues (Perez-Garcia et al., 2011b).

L'activité relative de ces deux voies d'assimilation du glucose est un bon exemple de la modification du profil d'expression génique par la lumière chez les algues. En effet, il a été démontré que chez *Chlorella sorokiniana*, en l'absence de lumière, la voie PPP est responsable de 90% de la distribution du flux métabolique du glucose via la glucose-6-phosphate déshydrogénase alors que la réaction catalysée par la glucose-6-phosphate isomérase de la voie EMP est pratiquement absente (Yang et al., 2000). Toutefois, en présence de lumière, l'inverse est observé et la voie EMP est la principale voie glycolytique observée. L'activité des cycles des acides tricarboxyliques (TCAs) et de la phosphorylation oxydative demeure toutefois élevée, même en présence de lumière chez

cette espèce (Yang et al., 2000). Ainsi, la présence de lumière pourrait réguler à la baisse l'activité de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase, responsable du flux métabolique vers la voie PPP.

Lors de l'ajout de glucose dans le milieu de culture, les cellules de *Chlorella* répondent en moins de 5 minutes par une hausse de l'expression du gène *hup1* (Perez-Garcia et al., 2011b). La protéine HUP1 codée par ce gène est responsable du transport actif du glucose à travers la membrane plasmique. Il est intéressant de noter que lors de la translocation du glucose par HUP1, il se produit un mouvement net de protons vers l'extérieur de la cellule (Perez-Garcia et al., 2011b). Ce relargage de H^+ provoque l'acidification du milieu de culture. L'abaissement du pH provoqué par cet échange hexose/ H^+ pourrait être responsable de l'inhibition de la croissance observée chez certaines espèces en présence d'une concentration trop élevée de DOC (Lee, 2004b). Une modification génétique a permis de faire passer l'algue verte *Volvox carteri* d'un métabolisme autotrophe strict à un métabolisme hétérotrophe par le simple ajout du gène *hup1* (Hallmann & Sumper, 1996).

2.3.3 Mixotrophie

La mixotrophie est une variante de l'hétérotrophie où le CO_2 et d'autres sources de DOC peuvent être assimilés simultanément (Lee, 2004a). Ceci implique la cohabitation dans la cellule des métabolismes de respiration cellulaire et de photosynthèse qui peuvent opérer en parallèle. Certaines espèces de microalgues ne sont pas de vraies mixotrophes et possèdent la capacité d'alterner entre les modes autotrophes et hétérotrophes dépendamment des conditions environnementales (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004). Ce mode de nutrition est apparu, ou a été conservé au fil de l'évolution parce qu'il représente un important avantage évolutif. En effet la versatilité de ces espèces en regard de leur dépendance à une source de carbone en particulier leur permet dans certains cas de survivre à l'absence de CO_2 ou de dominer des populations autotrophes strictes en présence de DOC. C'est sans doute pour cette raison qu'un grand nombre d'espèces de microalgues responsables des blooms phytoplanctoniques se retrouvent dans cette

catégorie (Burkholder et al., 2008). Il a déjà été démontré que la mixotrophie est une bonne stratégie pour la production d'une grande quantité de biomasse et la production de certains métabolites induits uniquement en présence de lumière (Perez-Garcia et al., 2011b). Plusieurs travaux ont démontré la possibilité d'utiliser des matières résiduelles industrielles tels des résidus de betterave à sucre ou de mélasse, pour la production d'espèces de *Spirulina* en conditions mixotrophes (Alberto Vieira Costa et al., 2004; Andrade & Costa, 2006; Barrocal et al., 2010; Chojnacka & Noworyta, 2004).

2.4 Bioraffinage

La valorisation de la biomasse microalgale par « bioraffinage » est une option qui est actuellement en développement afin de rendre cette industrie plus rentable économiquement (Yen et al., 2013). En effet, le concept de bioraffinage vise l'optimisation de l'utilisation de cette biomasse par fractionnement des diverses composantes (lipides, hydrates de carbone et protéines) pour leur valorisation individuelle. L'idée derrière ce concept est la mise en place d'une industrie offrant une multitude de produits commerciaux différents tels des produits chimiques spécialisés, des produits alimentaires et des huiles pouvant servir à l'industrie du biodiesel (Foley et al., 2011). Le concept en est à faire ses preuves à l'échelle pilote et des études de type « analyse de cycle de vie » sont actuellement en cours afin d'assurer sa viabilité énergétique et économique (Ibañez & Cifuentes, 2013). D'autre part, la biomasse microalgale peut également être utilisée comme un tout pour la production de nourriture animale ou de carburants renouvelables par liquéfaction hydrothermique (Frank et al., 2013).

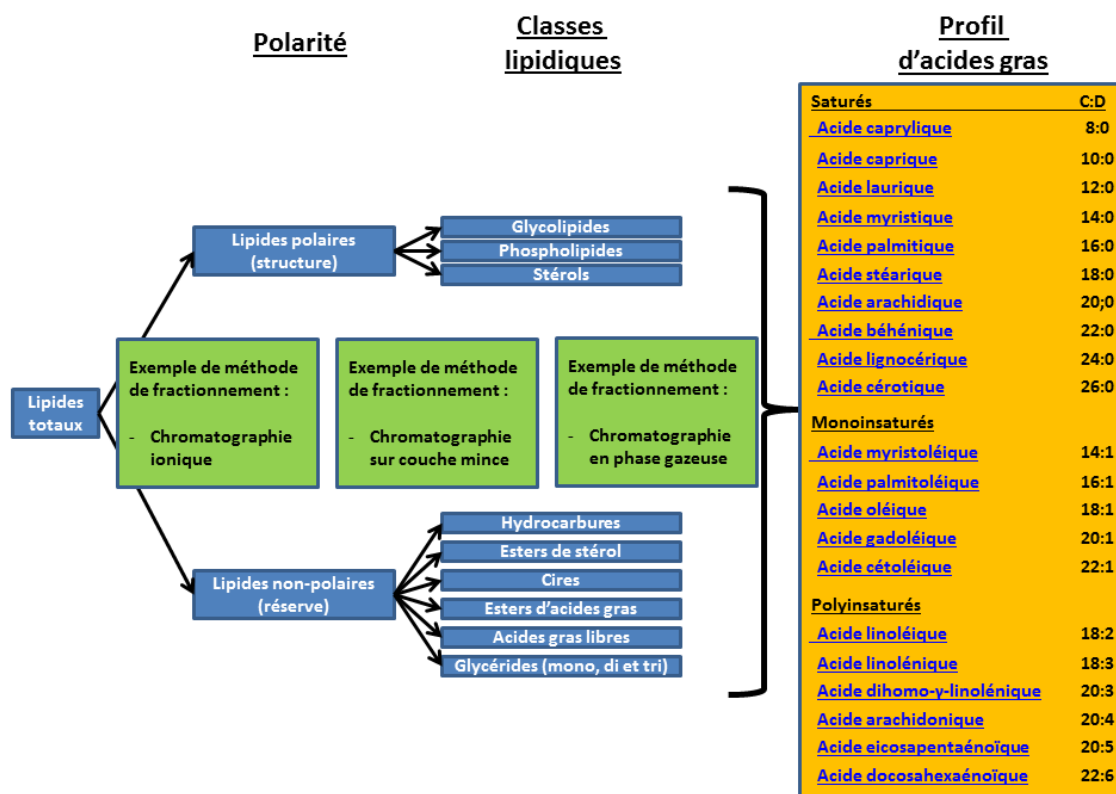
2.4.1 Lipides

De tous les produits biosourcés provenant des microalgues, ceux basés sur la fraction lipidique font actuellement, et de loin, l'objet du plus grand effort de recherche pour leur valorisation industrielle. Différentes expressions existent pour désigner la fraction de la biomasse résiduelle suite à l'étape d'extraction des lipides lors du bioraffinage de la

biomasse microalgale totale (tourteau, « microalgal cake » ou « lipid extracted algae ») (Lardon et al., 2009). Certaines avenues de valorisation globale, telles que l'alimentation animale ou la biométhanisation, sont actuellement envisagées pour cette fraction. Les huiles de microalgues pourraient remplacer les huiles végétales traditionnelles et animales dans toutes sortes d'applications commerciales telles que les surfactants, les lubrifiants, les polymères et les denrées alimentaires (Foley et al., 2011). Le succès d'un procédé industriel de production d'huiles microalgales est non seulement basé sur la quantité d'huile produite, mais aussi sur la qualité de ces huiles. En sélectionnant la bonne espèce de microalgue, en déterminant les conditions de culture optimales et/ou en mettant à profit le génie génétique (voir section 2.1.2), il est donc possible d'améliorer la productivité globale en huiles des cultures (rendement et taux de croissance ainsi que contenu lipidique cellulaire) et aussi de moduler le profil lipidique de ces huiles (classes de lipide présentes et profil en acides gras), et ce, afin de produire la bonne huile pour le bioproduit d'intérêt (Guihéneuf et al., 2009; Gupta et al., 2008; Tan & Lin, 2011). La figure 2.5 présente les trois principaux paliers et méthodes de fractionnement de l'extrait lipidique total permettant de déterminer le profil d'une huile donnée. L'intérêt pour les huiles microalgales est en grande partie basé sur la capacité de certains de ces microorganismes de 1- synthétiser certains acides gras polyinsaturés essentiels et 2- d'accumuler de grandes quantités de TAGs. Ainsi, plusieurs bioproduits à base de lipides de microalgues sont déjà disponibles sur le marché, ou en voie de l'être (Tableau 2.1) (Spolaore et al., 2006; Yen et al., 2013).

Le groupe des acides gras polyinsaturés (PUFAs) inclut l'ensemble des acides gras qui possèdent deux insaturations (liaisons double C=C) ou plus. Ils sont généralement retrouvés en majorité dans la fraction lipidique polaire composée en grande partie par des membranes cellulaires (lipides structuraux). Certains de ces acides gras à longues chaînes (> 20 atomes de carbone), tels l'acide docosahexaénoïque (DHA), l'acide éicosapentaénoïque (EPA) et l'acide arachidonique (AA), aussi appelés oméga-3 et oméga-6, sont essentiels à la croissance et la survie des animaux et ont des effets bénéfiques sur la santé humaine (Mimouni et al., 2012). Ces acides gras essentiels sont principalement retrouvés dans les végétaux et sont synthétisés par des voies

enzymatiques de désaturases et d'élongases à partir de deux acides gras précurseurs de 18 carbones, soit l'acide linoléique et l'acide linoléique. Les animaux supérieurs, ne possédant pas les enzymes nécessaires pour la synthèse de ces précurseurs, doivent donc se les procurer par l'intermédiaire de leur nourriture (Glencross, 2009).



Tiré de Bastien A. et al. (2013)

Figure 2.5 Paliers de détermination du profil lipidique d'un extrait lipidique total et exemples de méthodes analytiques de fractionnement.

Certaines espèces de microalgues, principalement d'origine marine, sont très riches en PUFA. Par exemple, les DHA, l'EPA, l'AA et l'acide γ-linolénique (GLA) se retrouvent en grande quantité dans des espèces de microalgues telles que *Cryptocodinium*, *Nannochloropsis*, *Porphyridium* et *Arthrospira* respectivement (Spolaore et al., 2006). La plupart des animaux marins ont par ailleurs complètement perdu leur capacité de

biosynthèse des acides gras essentiels et les PUFA contenus dans la chair de poisson sont d'origine microalgale. L'entreprise Martek Biosciences cultive depuis une dizaine d'années une version génétiquement modifiée de l'espèce *Cryptocodinium cohnii* en hétérotrophie à l'échelle industrielle pour la production de DHA destinés à l'industrie des suppléments alimentaires et des substituts de lait maternel.

Les TAGs sont des lipides non polaires pouvant être accumulés à des fins de réserve énergétique par les cellules eucaryotes. Certaines espèces de microalgues, appartenant principalement aux phyla *chlorophyta* et *heterokonta*, peuvent accumuler une grande quantité de TAG lorsque soumises à des conditions de culture particulières (Hu et al., 2008). Par contre, comme ces conditions de culture incluent souvent l'imposition de certains stress métabolique tels que des carences nutritionnelles, un important compromis doit être fait quant au taux de division cellulaire, et ainsi de productivité en biomasse des cultures.

Tableau 2.1 Exemples de produits commerciaux à base de lipides et de pigments de micro-algues.

Produits	Companies	Marché	Lieu	Année
Life's DHA™	Martek/ DSM	Alimentation	EU/ Suisse	2002
EPA/DHA	Sofiproteol/Ferm entalg/Proléalg	Alimentation	France	en cours
Algenist™	Sephora/ Solazyme	Cosmétiques	San Diego, CA	2013
Savons et produits de soins personnels	Unilever/ Solazyme	Cosmétiques	San Diego, CA	en cours
Huile isolante pour transformateur	DOW/ Solazyme	Produits chimiques spécialisés	San Diego, CA	en cours

Des recherches faisant intervenir les génies métabolique et génétique sont actuellement en cours afin de déterminer des conditions qui permettraient d'obtenir des cultures capables de combiner un « contenu élevé en TAG » avec un « taux de croissance élevé » (Klok et al., 2013; Wijffels & Barbosa, 2010). Cette caractéristique des microalgues intéresse particulièrement l'industrie pour la production de biodiesel et de bio-kérosène actuellement perçus comme la troisième génération de biocarburants. À ce jour aucune entreprise n'a pu démontrer la rentabilité de cette industrie. Cependant, le potentiel de productivité ainsi que l'absence de compétition avec l'industrie alimentaire continuent de susciter un vif intérêt tant du côté des industriels (Tableau 2.2) que des chercheurs en bioprocédés. Par exemple, l'entreprise Solazyme cultive actuellement plusieurs souches génétiquement modifiées de *Chlorella protothecoïdes* en hétérotrophie à l'échelle industrielle pour la production de biocarburants et d'autres produits à base d'huile de microalgues.

Les caroténoïdes (β -carotène, astaxanthine, lutéine, zéaxanthine, lycopène et bixine) et les phycobiliprotéines (phycocyanine et phycoérythrine) sont les principaux pigments produits à l'échelle industrielle à partir de microalgues. Les caroténoïdes sont principalement utilisés comme colorants alimentaires et comme suppléments pour l'alimentation animale (Goksan et al., 2010). Ils peuvent aussi être utilisés comme ingrédients cosmétiques. En plus de ces applications, plusieurs effets bénéfiques pour la santé humaine ont été démontrés dont l'apport en provitamine A (Spolaore et al., 2006). Ces produits naturels, en compétition avec les pigments synthétiques, sont toutefois considérés de qualité supérieure. La compagnie Mycrophyt commercialise de la biomasse des espèces *Haematococcus pluvialis* et *Porphyridium cruentum* pour leurs contenus élevés en astaxanthine et en zéaxanthine respectivement. D'autre part, les phycobiliprotéines sont utilisées dans les laboratoires de recherche pour leurs propriétés de coloration et de fluorescence et leur valeur marchande est supérieure à 60\$/mg. Aussi, des travaux sont en cours afin de déterminer le mécanisme d'action antibactérien de la marennine, un pigment bleu produit par l'espèce *Haslea ostrearia* (Gastineau et al., 2012; Tardy-Laporte et al., 2013).

Tableau 2.2 Exemples de compagnies qui travaillent à commercialiser des biocarburants à base de microalgues.

Compagnie	Localisation	Site web
Algenol Biofuels	Bonita Springs, FL, EU	www.algenolbiofuels.com
Aquaflow Nelson	Nelson, New Zealand	www.aquaflowgroup.com
Aurora Algae, Inc.	Hayward, CA, EU	www.aurorainc.com
Bioalgene	Seattle, WA, EU	www.bioalgene.com
Bionavitas, Inc.	Redmond, WA, EU	www.bionavitas.com
Bodega Algae, LLC	Boston, MA, EU	www.bodegaalgae.com
Cellana LLC	Kona, HI, EU	www.cellana.com
Ennesys	Orsay, France	www.ennesys.com
LiveFuels, Inc.	San Carlos, CA, EU	www.livefuels.com
PetroAlgae Inc.	Melbourne, FL, EU	www.petroalgae.com
Phyco Biosciences	Chandler, AZ, EU	www.phyco.net
Sapphire Energy, Inc.	San Diego, CA, EU	www.sapphireenergy.com
Seambiotic Ltd.	Tel Aviv, Israel	www.seambiotic.com
Solazyme, Inc.	South San Francisco,	www.solazyme.com
Solix Biofuels, Inc.	Fort Collins, CO, EU	www.solixbiofuels.com
Synthetic Genomics Inc.	La Jolla, CA, EU	www.syntheticgenomics.com

Mis à jour et adapté de Chisti and Yan (2011)

Les caroténoïdes sont abordés dans cette section car ils font partie de la famille des terpénoïdes, aussi appelés isoprénoïdes, une importante classe de lipides qui comprend également les phytols comme composants des chlorophylles et des tocophérols (vitamine E), ainsi que les stérols (Lohr et al., 2012). Plus de 150 formes de stérols ont été identifiées chez les plantes (Jäpelt & Jakobsen, 2013). La compagnie espagnole Greenaltech envisage la commercialisation de phytostérols d'origine microalgale pour les domaines de l'alimentation humaine, des suppléments diététiques et des cosmétiques. En effet, certaines formes bioactives permettent de réduire le taux de cholestérol sanguin (Plana et al., 2008). De plus, d'autres formes de stérols isolées à partir de *Dunaliella tertiolecta* ont montré une activité neuromodulatoire (Francavilla et al., 2012).

2.4.2 Protéines

Les protéines microalgales ainsi que les hydrolysats protéiques sont actuellement étudiés pour leurs propriétés antioxydantes, antihypertensives, anticoagulatives, antitumorales et immunostimulantes (Gerde et al., 2013; Samarakoon & Jeon, 2012; Sari et al., 2013; Vo et al., 2013), ou tout simplement pour leur valeur nutritive et leur contenu en acides aminés essentiels pour l'alimentation humaine ou animale (Becker, 2007). Dans le but d'obtenir ces molécules d'intérêt, deux approches sont étudiées. La première consiste à caractériser les extraits protéiques naturels (endogènes) des souches connues (Yen et al., 2013). L'autre voie consiste à utiliser le génie génétique pour la production de protéines (exogènes) déjà connues pour leur bioactivité (Cadoret et al., 2012; Lauersen et al., 2013).

2.4.3 Hydrates de carbone

Les microalgues peuvent également représenter une source d'hydrates de carbone de par la cellulose de leur paroi cellulaire et leurs réserves d'amidon contenues dans le plaste. Certaines espèces de microalgues, telle *Dunaliella tertiolecta*, produisent également des polysaccharides extracellulaires (Geun Goo et al., 2013). Ces hydrates de carbone peuvent être utilisés pour la fermentation d'autres microorganismes et la production de biogaz et de bioéthanol (voir section 2.5.1)(Chen et al., 2013). Par exemple, l'extraction des sucres à partir de la biomasse microalgale peut être effectuée par ultrasons, suivi d'une hydrolyse chimique de l'amidon afin de fournir le glucose nécessaire à la production de bioéthanol par la levure *Rhodotorula toruloides* (Zhao et al., 2013).

2.4.4 Applications commerciales de la biomasse microalgale entière

La biomasse microalgale peut également être utilisée sans bioraffinage de ses composantes organiques, pour l'alimentation humaine ou animale, ou pour la production de carburants renouvelables. Plus de 30 % de la production mondiale de microalgues est actuellement destinée à l'alimentation animale (Spolaore et al., 2006). Pour l'aquaculture,

la production de microalgues sert à nourrir les larves de mollusques, ou indirectement les proies des larves de crustacés et de poissons (Brown et al., 1997; Marchetti et al., 2012). Son usage est bénéfique pour la nutrition, la coloration de la chair des saumons ou pour induire d'autres activités biologiques chez ces animaux d'élevage. Les genres les plus fréquemment utilisés pour l'aquaculture sont : *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* et *Thalassiosira*. Le contenu lipidique des espèces choisies est d'une importance majeure, car les microalgues sont la source principale d'PUFAs essentiels des écosystèmes aquatiques. L'espèce *Arthrospira* est une excellente source de protéines et est utilisée comme supplément alimentaire pour plusieurs types d'animaux : chats, chiens, poissons d'aquarium, oiseaux, chevaux, bétail (Harun et al., 2010). D'autres entreprises se tournent vers la production de microalgues pour l'alimentation humaine et des farines à base de microalgues commencent à faire leur apparition sur les marchés.

Le coût énergétique élevé des étapes de séchage de la biomasse microalgale (3,6 MJ / kg d'eau évaporée) et de lyse cellulaire, nécessaires pour le fractionnement de la biomasse par bioraffinage, a orienté les chercheurs de la filière « biocarburants » vers le développement de méthodes alternatives (Xu et al., 2011). L'une de ces méthodes, la liquéfaction hydrothermique (HTL), permet la conversion directe d'une biomasse humide (10-20% m/v) en huile, suite à une exposition d'environ 15-30 minutes à des températures pouvant varier entre 250-400°C et des pressions de 10-20 MPa en présence d'un catalyseur. Ce procédé permet d'accroître la conversion car, en plus des lipides, une partie des protéines et des hydrates de carbone sont aussi convertis en huile-HTL. De plus, l'huile-HTL peut être directement traitée dans les installations déjà existantes pour le raffinage pétrochimique (Huber & Corma, 2007). Ce procédé permet la production d'un diesel dit « renouvelable ». Une récente analyse de cycle de vie comparant les deux voies a permis de démontrer le potentiel de la HTL sur le plan du bilan énergétique (Frank et al., 2013). Le contenu élevé en oxygène et en azote de certaines huiles-HTL fait actuellement l'objet de recherches pour le développement de stratégies permettant d'améliorer la composition élémentaire de ces huiles (Mørup et al., 2012). La valorisation

des protéines et le recyclage des nutriments contenus dans les déchets aqueux de la HTL est aussi étudié (Biller et al., 2013).

2.5 Biocarburants de troisième génération

2.5.1 Bioéthanol et biométhane

Les microalgues peuvent être utilisées comme biomasse dans divers procédés de fermentation par d'autres microorganismes (bactéries, levures ou autres moisissures) pour la production de bioéthanol et de biométhane. Entre autres, un système de production d'éthanol par fermentation de microalgues a été récemment breveté (Mohamed et al., 2011). Ce système propose la récupération du CO₂ émis lors de la fermentation, pour la culture des microalgues. Suite au processus de fermentation, la biomasse microalgale restante est digérée en conditions anaérobiques afin de produire du biométhane. Toutefois, ce type de production demeure à l'échelle expérimentale et aucune technologie n'a été commercialisée jusqu'à maintenant (Harun et al., 2010).

2.5.2 Biodiesel

Ce sont présentement les huiles extraites de plantes oléagineuses terrestres telles que le canola, le soya, le tournesol et le palmier à huile qui sont principalement utilisées pour la production de biodiesel. Dans les années 80-90, une vaste étude sur le potentiel de production de biodiesel à partir de microalgues a été menée par le « National Renewable Energy Laboratory » aux États-Unis (Sheehan et al., 1998). Le « Aquatic Species Program » a permis d'obtenir de l'information sur plus de 3000 espèces de microalgues et a ouvert la voie à un grand nombre d'avancées scientifiques sur les plans de la physiologie, la biochimie et les manipulations génétiques. Une des principales conclusions du rapport final est la faisabilité technique d'une production industrielle de biodiesel algal, mais ceci, à des coûts trop élevés et non compétitifs avec les carburants fossiles traditionnels (Sheehan et al., 1998). Avec l'avènement de nouvelles préoccupations liées au réchauffement climatique et à la diminution des stocks

mondiaux de pétrole, la communauté internationale cherche actuellement une alternative à la production d'énergie par les combustibles fossiles et l'option des algocarburants est à reconsidérer (Chisti, 2007).

Les microalgues représentent une alternative intéressante aux oléagineux terrestres pour différentes raisons. D'abord, la possibilité d'utiliser des espaces impropres à la culture de céréales et autres plantes pouvant servir à l'alimentation humaine rend le projet acceptable socialement dans un contexte où la famine sévit encore dans plusieurs pays. Ensuite, le potentiel de production de litres de biodiesel par hectare par jour pourrait être de loin supérieur. Ceci est dû au contenu élevé en lipides de certaines espèces de microalgues et à leur rythme élevé de division cellulaire et donc, de production de biomasse (Williams & Laurens, 2010). Aussi, la mise en place d'un procédé industriel est envisageable à l'année, dans des conditions indépendantes des variations climatiques.

2.5.3 Propriétés du biodiesel

Le biodiesel est produit par une réaction appelée transestérification (figure 2.6). Dans cette réaction, 1 mole de TAG réagit avec 3 moles d'un alcool, le plus souvent du méthanol, pour former 1 mole de glycérol et 3 moles de méthyl esters d'acides gras (FAME) (Ramos et al., 2009). Les TAGs sont composés de trois molécules d'acides gras reliés ensemble par une molécule de glycérol. Ces acides gras peuvent être de trois types : saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés. Le degré de saturation dépend du nombre de doubles liaisons présentes dans la molécule.

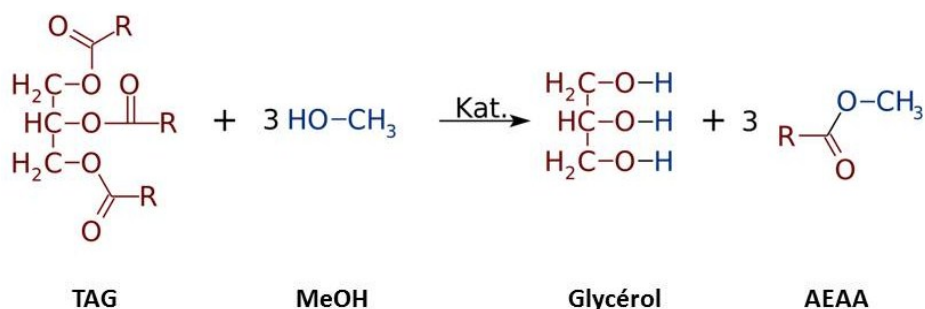


Figure 2.6 Représentation chimique de la réaction de transestérification

Les propriétés physico-chimiques du biodiesel produit dépendent de la longueur et du degré de saturation des chaînes de carbone des acides gras. Ces propriétés doivent correspondre à certaines normes standards avant que le produit puisse être commercialisé sur un territoire donné (standard américain ASTM D6751, standard européen EN 14214). Certains paramètres (contenu en ester, contenu en méthanol, viscosité cinématique 40°C, valeur acide, point éclair, contenu en monoglycérides, diglycérides et TAGs, glycérol libre et total) dépendent principalement du degré de raffinement des huiles, du procédé de transestérification et de la qualité des étapes de purification de phase. Les propriétés qui sont dépendantes du profil lipidique des huiles utilisées sont l'indice de cétane, l'indice d'iode, la stabilité oxydative et la température limite de filtrabilité (CFPP).

L'indice de cétane est largement utilisé pour évaluer la qualité d'un biodiesel et il est le pendant de l'indice d'octane de l'essence. Plus l'indice de cétane est élevé, meilleure est la combustion et surtout le délai d'ignition du carburant. Cette propriété est grandement dépendante des caractéristiques des acides gras. Plus les chaînes d'acides gras sont longues et plus elles sont saturées (ou monoinsaturées), plus l'indice de cétane sera élevé. Selon le standard EN 12214, l'indice de cétanes pour un biodiesel d'origine végétal doit être d'au moins 51, alors que le standard ASTM D6751 exige un minimum de 47.

L'indice d'iode est une mesure du niveau d'insaturation totale d'un mélange d'acides gras. C'est une mesure de la masse d'iode (I_2) capable de réagir avec 100 g d'acides gras d'un échantillon donné. L'iode interagit exclusivement avec les doubles liaisons des acides gras. Il est intéressant de noter que l'indice d'iode d'une huile végétale ou animale est presque identique à celle de ses esters méthyliques correspondants obtenus à la suite de la réaction de transestérification. La limite maximale de cet indice est de 120 g / 100 g d'acides gras selon le standard EN 12214 alors que le standard ASTM D6751 ne spécifie aucune valeur. La limitation du degré d'insaturation est nécessaire, car le chauffage d'acides gras insaturés résulte en la polymérisation des glycérides, la formation de dépôts et la détérioration des lubrifiants (Ramos et al., 2009).

La stabilité oxydative est une mesure de résistance à l'oxydation d'un carburant soumis à un jet d'air constant à 110°C. La quantité d'acides volatiles est mesurée en continu au cours de l'expérience par une mesure de conductivité de l'air et elle doit être inférieure à un certain seuil pendant 6 heures selon le standard EN 12214 et pendant 3 heures selon le standard ASTM D6751. Il est très difficile de répondre à ce standard sans l'ajout d'antioxydants au biodiesel. Cependant, il a été observé que des huiles végétales avec un contenu élevé en acides linoléique et linolénique (C18:2 et C18:3) ont tendance à avoir une faible stabilité oxydative comparativement aux huiles à contenu faible en PUFAs (Agarwal et al., 2010).

La CFPP est la température la plus basse, exprimée en °C, à laquelle un volume donné de diesel passe encore à travers une unité de filtration standardisée. Aucun standard n'est spécifié par EN 12214 ou ASTM D6751. Les carburants développent typiquement des problèmes de dépôts de cire et de congestion des filtres et des injecteurs à des températures de -10 à -15°C. Lorsque le biodiesel est refroidi, les esters méthyliques des acides palmitique et stéarique (C16:0 et C18:0) sont les premiers à précipiter et représentent une grande partie du matériel qui bouche les filtres des moteurs testés. Des stocks d'huiles végétales riches en acides gras saturés à longues chaînes (C22:0 et C24:0) produiront donc un biocarburant mal adapté pour des températures inférieures à 0°C (Ramos et al., 2009).

En bref, plusieurs études ont permis de comparer les propriétés de biodiesels produits à partir de différentes huiles d'origine végétale (Agarwal et al., 2010; Ramos et al., 2009; Stansell et al., 2012). Ces études s'entendent pour dire que les propriétés recherchées sont des acides gras à longues chaînes, i.e. des acides gras de 12 à 22 atomes de carbone, saturés ou mono-insaturés. Les microalgues marines sont caractérisées par des niveaux de PUFAs nettement supérieurs à ceux observés chez les microalgues d'eau douce (Lang et al., 2011). Cette caractéristique favorise donc les espèces d'eau douce pour la production de biodiesel. Dans les régions froides du nord de l'Amérique, il semble essentiel de considérer la CFPP comme une propriété importante. Dans cette optique, les microalgues

produisant des acides gras monoinsaturés avec des chaînes de carbone d'une longueur inférieure à 22 atomes sont à privilégier (C16 :1; C18 :1; C20 :1).

2.6 Valorisation du lactosérum

Le lactosérum, aussi appelé petit lait, est la partie liquide issue de la coagulation du lait. Il est composé à 94% (V/V) d'eau, 4-5% (m/V) de lactose et 0,5-1% (m/V) de protéines laitières, de vitamines et de minéraux (Smithers, 2008). C'est le principal produit secondaire obtenu lors de la fabrication du fromage. Une réglementation stricte existe quant au traitement et au rejet de cet important coproduit industriel car il représente l'un des rejets industriels les plus polluants (demande biochimique en oxygène > 35 000 ppm; demande chimique en oxygène > 60 000 ppm). Au Canada, 2 100 000 de tonnes de lactosérum sont produites chaque année, dont 1 200 000 tonnes au Québec.

Divers procédés existent actuellement pour récupérer les constituants du lactosérum. L'un d'entre eux consiste à concentrer les protéines laitières par filtration. À l'intérieur de ce procédé, le filtrat, ou concentré de protéines de lactosérum, peut être directement ajouté aux fromages et au yaourt afin d'en augmenter la valeur nutritive et la qualité des produits, ou encore séché et vendu sous la forme d'une poudre alimentaire. En effet, les protéines de lactosérum (β -lactoglobuline, α -lactalbumine, immunoglobuline, albumine sérique bovine, lactoferrine, lactoperoxydase et glycomacropeptide) sont des aliments fonctionnels et produits de santé reconnus (Solak & Akin, 2012). Cependant, il est à noter qu'aucune stratégie de valorisation du lactosérum n'atteindra cet objectif sans valoriser le lactose car ce dernier représente plus de 75% des solides dissous du lactosérum (Smithers, 2008). Ainsi, d'autres avenues de valorisation doivent être développées pour le perméat de lactosérum, ou concentré de lactose. Ce coproduit est actuellement utilisé directement dans l'alimentation porcine, ou plus rarement séché et vendu sous la forme d'une poudre de lactose. Il représente donc une source de carbone organique abordable et facilement accessible partout dans le monde.

2.6.1 Utilisation du lactose par les microalgues

Jusqu'à ce jour, les essais de culture de microalgues effectués avec le lactose comme source de DOC se sont avérés peu concluants (Ceron Garcia et al., 2006; Samejima & Myers, 1958; Theriault, 1965; Wang & Peng, 2008). En effet, la présence de lactose dans le milieu de culture des algues testées ne semble pas stimuler leur croissance comparativement aux contrôles. Toutefois, certaines espèces de microalgues présentent une activité β -galactosidase (Davies et al., 1994). Cette enzyme est responsable du clivage du disaccharide lactose (figure 2.7) en ses deux constituantes : le glucose et le galactose. La présence d'une telle activité enzymatique chez ces espèces de microalgues mixotrophes leur permet théoriquement de pouvoir utiliser le lactose pour leur croissance. De plus, la présence de lactosérum dans le milieu de culture a déjà permis de stimuler la croissance des microalgues *Anacystis nidulans*, *Nannochloris sp.*, *Dunaliella tertiolecta* et *Euglena gracilis* (Durmus et al., 1999; Freyssinet & Nigon, 1980) et de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Silva et al., 2010). Cette stimulation pourrait être attribuable à l'utilisation du lactose et/ou aux autres constituantes du lactosérum. En effet, il a récemment été démontré que l'ajout d'une poudre de lactosérum brut au milieu de culture pouvait stimuler la croissance de *Chlorella vulgaris* (Abreu et al., 2012). Cette stimulation pourrait être due à la présence de certains nutriments tels le phosphore et calcium. Une hydrolyse préalable du lactose a également permis de stimuler significativement les rendements de biomasse et le taux de croissance de culture de cette espèce grâce à l'utilisation du glucose et du galactose comme source de DOC en conditions mixotrophes (Abreu et al., 2012).

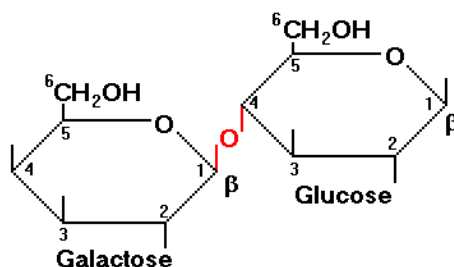


Figure 2.7 Structure moléculaire du lactose.

Le prochain chapitre présente une méthode multicritères de sélection de souche de microalgues pour un procédé de production d'une biomasse oléagineuse en conditions mixotrophes pour le biodiesel. La détermination des principaux paramètres du procédé tient compte du contexte géographique et technique canadien.

CHAPITRE 3 Une approche multicritères de sélection de souches de microalgues pour la production de biodiesel et autres applications commerciales

Avant-propos

Auteurs et affiliation :

Jean-Michel Girard : étudiant au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Viviane Bélair : étudiante au doctorat, université McGill.

Alexandre Boudreau : étudiant à la maîtrise, Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski.

Nathalie Fauchoux : professeure, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Michèle Heitz : professeure, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Réjean Tremblay : professeur, Institut des Sciences de la Mer.

Jean-Sébastien Deschênes : professeur, Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski.

Date de soumission :

Octobre 2014

Revue :

Aquaculture

Titre français :

Une approche multicritères de sélection de souches de microalgues pour la production de biodiesel et autres applications commerciales

Contribution au document :

Cet article contribue à la thèse en présentant une procédure qui permet de prendre en considération plusieurs critères et indicateurs lors de la sélection d'une souche de microalgue pour des applications commerciales. La quantité croissante d'informations pouvant être colligée sur de multiples espèces de microalgues à partir de la littérature justifie le développement et la standardisation d'un tel système multicritères.

Résumé français :

Ce chapitre propose une méthodologie rigoureuse pour la sélection de souches de microalgues pour des applications commerciales. La procédure a été divisée en deux étapes et permet de considérer plusieurs aspects importants du procédé tels que la nature des produits finaux, les systèmes de production, la récolte de la biomasse, les méthodes d'extraction des métabolites d'intérêt ainsi que les stratégies pour l'amélioration continue du processus. Dans la première étape de sélection, 10 souches de microalgues ont été présélectionnées en fonction de critères de discrimination binaires simples et sans équivoque. Dans la deuxième étape, un total de six critères généraux (avec leurs indicateurs associés) ont été considérés, et une note (0 à 10) par critère a été attribuée à chaque souche présélectionnée. La méthode d'Ulrich a ensuite été adaptée afin de construire une matrice de sélection de manière à déterminer l'importance relative de chaque critère. Cette approche a été appliquée pour la sélection d'une souche de microalgues dans le but de produire du biodiesel dans le contexte géographique et technique canadien (hiver avec couvert de glace). Cette approche multicritères pourrait facilement être utilisée pour différents contextes et objectifs de production de masse de microalgues.

A multi-criteria approach for microalgae strain selection for biodiesel production and other commercial applications

*Jean-Michel Girard¹²³, Viviane Bélair, Alexandre Boudreau², Nathalie Fauchoux¹,
Michèle Heitz¹, Réjean Tremblay³, Jean-Sébastien Deschênes²*

¹ Département de Génie Chimique et Génie Biotechnologique, Université de Sherbrooke
2500, boul. de l'Université, Sherbrooke (Québec) Canada, J1K 2R1;

² Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à
Rimouski,

300, allée des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1;

³ Institut des Sciences de la Mer,
310, allée des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1

Abstract

This paper suggests a rigorous methodology for microalgae strain selection for commercial applications. The procedure was divided in two stages and considered critical aspects of microalgae cultivation including nature of the end products, production systems, harvesting, extraction methods and strategies for continuous improvement of the process. In the first selection stage, 10 microalgae strains were pre-selected according to simple, unequivocal and discriminating criteria. In the second stage, a total of six general criteria (with associated sets of indicators) were determined, and a score (from 0 to 10) was attributed to each pre-selected strain. A selection matrix was then constructed to determine the relative importance (weight) of each criterion using the Ulrich method. This approach was applied for the selection of a microalgae strain for biodiesel production, in the Canadian (winter with ice cover) particular geographical and technical context. We suggest that this multi-criteria approach could be easily used for different contexts and objectives of microalgae mass production.

Keywords: Lipid productivity, fatty acid profile, co-products, mixo/heterotrophy, Ulrich method

3.1 Introduction

Microalgae cultivation offers tremendous potential for the production of a wide diversity of consumer products. In the energy field, while lipids can be used to produce biodiesel, carbohydrates and proteins can be considered for the production of other classes of biofuels, such as alcohols or biogas through fermentation by other microorganisms (Beer et al., 2009; Yi-Xin et al., 2011). In the dietary field, microalga is an important source of functional food such as polyunsaturated fatty acids and antioxidant pigments, and could also become an important source of proteins to serve as human and animal feed (Becker, 2007; Williams & Laurens, 2010). Fractionating the microalgal biomass by “biorefining” to obtain multiple end products from a single biomass feedstock is an option that is currently in development to increase the profitability of this industry (Yen et al., 2013). On the other hand, the microalgal biomass can also be used as a whole for the production of renewable fuels (Frank et al., 2013).

This diversity of actual and potential commercial applications is supported by the important microalgae biodiversity estimated to range between 200 000 and several millions different species (Cadoret & Bernard, 2008). Although this biodiversity remains largely unexplored, numerous strains are already available in culture collections around the world. Moreover, intraspecific biochemical composition, and therefore potential for a given bioproduct, can vary depending on culture conditions and provenance of the particular strain (Gong & Jiang, 2011; Shen et al., 2010). In the elaboration of a microalgae mass production process for a particular commercial application, one of the early critical steps is therefore the selection of a microalgae strain. This is generally realized by theoretical and/or empirical preliminary studies, that consider a definite number of selection criteria (Brown et al., 1998; Mimouni et al., 2012; Park et al., 2012; Rodolfi et al., 2009). In the particular case of microalgal biodiesel production, selection criteria commonly considered are high lipid productivity and adequate fatty acid profile (Gouveia & Oliveira, 2009; Griffiths et al., 2012; Rodolfi et al., 2009). However, several other economical, technical and environmental parameters could greatly influence the outcome of such a selection process. Some of these parameters include adaptation of the

strain to the selected production system, susceptibility to the selected lipid extraction method and valorisation potential of the microalgal cake. The work currently available in the literature considers these aspects separately and it will be easier to develop standardized procedures that allows considering all the parameters likely to influence the choice of the strain to be privileged for a particular context, and also to weight their relative importance in the balance of this process.

Some of these parameters are largely dictated by the geographical and technical context of the eventual plant, and certain critical aspects of the production process should therefore be predetermined in order to optimize the selection procedure. For example, at high latitudes ($> 45^\circ$), the cold temperatures and low solar radiation during winter are too hostile for outdoor cultivation (Williams & Laurens, 2010). For this reason, research must be oriented towards use (and design) of large-scale indoor bioreactors and process development using suitable microalgae strains. Moreover, in contexts of reduced solar radiation during winter, the capacity of a given strain to grow under mixo/heterotrophic conditions can prove a major asset; as such nutrition modes typically allow higher productivities while reducing the light requirements of the culture (Perez-Garcia et al., 2011b).

In the present work, a two stages multi-criteria approach, followed by relative weight determination of each criteria using the Ulrich method (Ulrich & Eppinger, 2007) is proposed to serve as a blueprint for optimal microalgae strain selection for commercial applications. The approach has been applied to our specific geographical and technical context with the objective of selecting a microalgae strain for biodiesel production. Thus, selection criteria were oriented towards: i) suitability of strains for cultivation in bioreactors under photoauto/mixo/heterotrophic conditions, ii) settling potential, iii) susceptibility to lipid extraction technologies, iii) potential for high value co-products and genetic improvements and iv) other environmental considerations.

3.2 Materiel and methods

3.2.1 Selection procedure

First stage

A short list of simple, unequivocal and discriminating binary criteria was first used to rapidly restrain the list of candidate to approximately 10 strains. Determination of these criteria was done based on the predetermined process parameters. Combined information from laboratory experiments and the literature was then used to further characterize these strains.

Second stage

The pre-selected strains were submitted to a second evaluation in order to objectively compare their intrinsic ability to meet the combined expectations from the following six (6) general criteria: 1- productivity and quality of the main product, 2- productivity and quality of the co-products, 3- adaptation to selected cultivation system, 4- susceptibility to harvesting and extraction techniques, 5- expected potential for process improvements and 6- environmental considerations. A number of potential indicators can be used in the evaluation of each criterion, depending on available information. A final score between 0 and 10 is then attributed to each strain (for each criterion), depending on their ability to fulfill the expectations raised by each of the indicators. Methods of point attribution must be clearly defined for each selected indicator.

Category weighting

The weight of each individual criterion was determined using the Ulrich method, which is commonly used in design engineering for concept selection (Ulrich & Eppinger, 2007). It involves the distribution of the criteria in a comparison matrix, which allows computing a score based on their relative importance to each other. A resolution ranging from 1 to 5 was used here to determine the relative importance of each criterion, a score of 1 meaning “much less important”, 3 meaning “equally important” and 5 meaning “much more important”. Note that other resolutions can be used if a more precise comparison is possible.

3.2.2 Experimental procedure

The pre-selected strains were ordered from cultures collections in the Canada (Canadian Phycological Culture Center) and the US (National Center for Marine Algae and Microbiota, The Collection Culture of Algae at the University of Texas and American Type Culture Collection) to conduct experimental determination of the “productivity and quality of the main product” criterion (in this case lipids).

Each strain was cultivated in the culture medium recommended by the supplier. All inoculum were brought to exponential growth stage, in 50 mL Erlenmeyer flasks. For each strain, duplicate test cultures (900 mL in 1L Erlenmeyer flasks) were inoculated at an initial cell concentration of 0.5×10^6 cells mL⁻¹, and then kept in a home-made air-lift systems under constant aeration (≈ 0.3 L min⁻¹) and illumination ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, except *Schizochytrium limacinum* which was kept in continuous darkness) at 20 °C in a plant growth incubation system (GC-300, MBI Lab Equipment, QC, Canada). Manual agitation was performed daily.

Cultures were sampled (10 mL) every day to perform manual cellular counts by hemacytometer until reaching stationary growth stage (8 to 14 days). At the end of the experiment, cultures were harvested to perform dry weight and lipid analysis. Duplicate of 5 mL of microalgae culture were sampled on 25 mm GF/C filters pre-burned (450°C for 2h) and weighed. One replicate was used for dry mass estimation (70°C for 24h) and the others preserved in 4 mL amber glass vials with 2 mL of dichloromethane:methanol (2:1 v/v) under nitrogen atmosphere at -80°C until lipids analysis.

Lipids were extracted using a modified Folch procedure described in Parrish (1999). Extracts were spotted on silica gel-coated chromarods (SIII, Iatron Laboratories, Shell USA, Spotsylvania, VA, USA) and lipid classes determined by thin layer chromatography and a flame ionization detection system (Iatroscan MK-6, Iatron Laboratories). Integration software (Peak Simple 3.2, SRI, Torrance, CA, USA) was used

to analyze chromatograms of each lipid class. Total lipid was obtained by the summation of all lipid classes.

Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared according to a method described in Lepage and Roy (1984) by direct transesterification and analysed in full scan mode (ionic range: 50–650 m/z) on a Polaris Q ion trap coupled to a Trace GC ultra (Thermo Scientific) equipped with an autosampler model Triplus, a PTV injector and a mass detector model ITQ900 (Thermo Scientific). The separation was performed with an Omegawax 250 (Supelco) capillary column with high purity helium as a carrier gas. Data were treated using Xcalibur v.2.1 software (Thermo Scientific). Methyl nonadecanoate (19:0) was used as an internal standard. FAMES were identified and quantified by the use of known standards (Supelco 37 Component FAME Mix and menhaden oil; Supelco), and were further confirmed by mass spectrometry (Xcalibur v. 2.1 software).

3.3 Results and discussion

3.3.1 Predetermination of critical aspects of the production process

A number of technical criteria can be determined upstream of the microalgae strain selection procedure (MSSP) to get more information about the characteristics sought in the selected species. Table 3.1 presents the choices that were made for the present case study designed to test the MSSP that was developed in our laboratory. We therefore assume that the more information that can be provided on each of these critical process parameters, the more accurate will be the outcome of the procedure. These choices can be dictated by the geographic localization of the eventual plant, the socioeconomic and environmental context or the technologies and knowledge available.

Table 3.1 Upstream determination of critical process parameters

Process parameter	
Location of the plant	Quebec – Canada
Main product	Biodiesel
Secondary product	Proteins (alimentation)
Production system	Bioreactors
Harvesting method	Natural settling
Extraction technology	Supercritical CO ₂
Strategy for continuous improvement	Genetic engineering – mixo/heterotrophy

3.3.2 First stage of selection: from a 100 to 10 candidates

In the first stage of selection, based on three unequivocal selection criteria, 10 microalgae strains were retained for further consideration (Table 3.2) from an initial list of >100 microalgae species (Annexe A) built from citations in the biodiesel oriented scientific literature, mainly the review papers, over the last five years. The three binary criteria used here were: 1- high lipid contents reported in the literature (>30% dry weight biomass), 2- mixo/heterotrophic potential and 3- availability in axenic culture collection in Canada or the U.S.. Determination of these criteria was made using the information presented in Table 3.1. High cellular lipids content is important and determines the proportion of the biomass available for conversion into biodiesel. Also, the selection of mixo/heterotrophic strains is oriented with the continuous improvements strategy. However, in these conditions, the risks of contamination of cultures by other microorganisms are greatly increased due to the presence of a dissolved organic carbon (DOC) source and therefore the need to start with axenic cultures. The ten microalgae strains retained for the second stage of selection were: *Ankistrodesmus convolutus*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Navicula pelliculosa*, *Nitzschia palea*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus obliquus* and *Schizochytrium limacinum*.

Table 3.2 List of pre-selected strains.

Specie	Abbr	Strain number	Culture medium	Fresh water	Marine
<i>Ankistrodesmus convolutus</i>	Ac	CPCC ^a 309	BBM	X	
<i>Chlorella protothecoides</i>	Cp	UTEX ^b 255	Proteose	X	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cv	UTEX ^b 2714	Proteose	X	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	No	CCMP ^c 525	f/2		X
<i>Navicula pelliculosa</i>	Na	CPCC ^a 552	CHU-10	X	
<i>Nitzschia palea</i>	Ni	CPCC ^a 160	CHU-10	X	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Pt	CCMP ^c 632	f/2 + Si		X
<i>Scenedesmus acutus</i>	Sa	CPCC ^a 10	BBM	X	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	So	CPCC ^a 5	BBM	X	
<i>Schizochytrium limacinum</i>	Sl	ATCC ^d MYA-1381	790 By+		X

^a Canadian Phycological Culture Center

^b The Collection Culture of Algae at the University of Texas at Austin

^c National Center for Marine Algae and Microbiota

^d American Type Culture Collection

3.3.3 Second stage of selection: scoring the candidates

The second stage of selection is defined by six criteria. A score between 0 and 10 was attributed to each strain (for each criteria), depending on their ability to fulfill the expectations raised by two indicators (Table 3.3). Once again, the determination of these criteria/indicators was made using the information presented in Table 3.1.

Table 3.3 Detailed description of scores attribution for each selected set of indicators of the six selection criteria.

Criteria	Indicators	Methods of points attribution
A. Productivity and quality of the main product (biodiesel)	1. TAG productivity	Proportional : 100% of points for a productivity $\geq 17 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$
	2. Fatty acid profile	Distance from the « green zone » (Figure 3.1)
B. Productivity and quality of the secondary product (proteins)	1. Protein content in lipid rich culture	Distance from the « green zone » (Figure 3.2)
	2. Essential amino acids content	EAAI ≥ 1 = 5 pt EAAI ≤ 0.5 = 0 pt
C. Adaptation to cultivation system (bioreactors)	1. Shear stress tolerance	Proportional : 100% of points for cells $\leq 10 \mu\text{m}$
	2. Biofilm and aggregate production	Qualitative evaluation (see text for details)
D. Susceptibility to harvesting and extraction methods (settling - SFE)	1. Settling potential	Proportional : 100% of points for 100% recovery after 24h
	2. Susceptibility to SFE	Composition of the cell wall (silicious = 5 pt, cellulose = 0 pt)
E. Potential for process improvements (genetic engineering - mixo/heterotrophy)	1. Optimized genetic transformation protocol	If available = 5 pt If not = 0 pt
	2. Affordable DOC sources	Proportional : 100% of points for ≥ 5 known source
F. Environmental considerations	1. Indigenous species	Isolated in Canada = 5 pt, US = 2.5 pt, others = 0 pt
	2. Toxin production	0 points for toxin productive strains, 5 point for the others

3.3.4 Criterion A: Productivity and quality of the main product (Lipids)

The data used to score the strains according to their triglycerides (TAG) productivity and suitability of their fatty acid (FA) profile for the production of biodiesel was obtained experimentally (Table 3.4). The TAG productivity was selected as indicator because this

class of neutral lipids is the favored biodiesel feedstock (Hu et al., 2008). Indeed, free fatty acids, sterols and phosphate group of the phospholipids makes these classes of lipids respectively uninteresting or problematic (saponification) to the transesterification step leading to biodiesel production (Pruvost et al., 2009). *N. oculata* presented the highest TAG productivity because it combined high biomass productivity, high lipid content of which a high proportion were TAGs, whereas *S. obliquus*, although it presented the highest lipid content (61.9% of the dry biomass) presented an average TAG productivity.

The FA profiles are also important lipid-related indicators for the stability of the biodiesel and they are presented in Figure 3.1 according to the triangular graph method of analysis developed by Ramos et al. (2009). According to this method, it is possible to determine if a given vegetable oil will produce a biodiesel that comply with the American (ASTM D6751) and European Standards (EN 14214). This is estimated by the proportions of saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids that compose the total FA pool. Indeed, the degree of saturation greatly affects some important physicochemical properties of biodiesel such as cetane number, oxidation stability and cold flow properties (Ramos et al., 2009). None of the strains presented a FA profile that fitted in the “green zone” of the graph. However the diatoms *N. palea* and *N. pelliculosa* were the closest, followed by the two *Scenedesmus* spp..

Schizochitrium limacinum presented the less interesting lipid profile for biodiesel because of the low MUFA proportion, and this was supported by results obtained from the literature (Johnson & Wen, 2009). High proportion of PUFA make however this strain a good candidate for the production of omega-3 for the dietary supplement market, particularly docosahexaenoic acid (DHA).

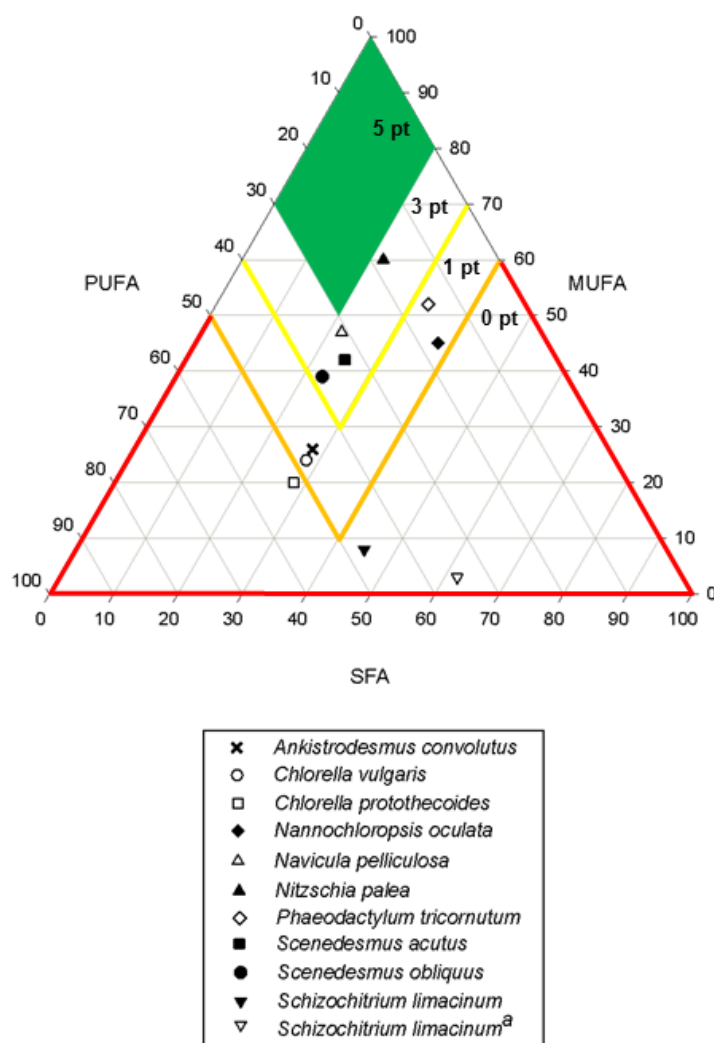


Figure 3.1 Triangular graph showing the proportions (%) of saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids in the total lipid pool of the 10 preselected strains.

3.3.5 Criterion B: Productivity and quality of the secondary product (proteins)

Williams and Laurens (2010) proposed that combining the production of microalgal biodiesel with proteins destined to human or animal feed would stimulate the profitability of the process. They also outlined the importance of considering two indicators: 1- propensity to accumulate lipids by conversion of carbohydrate instead of proteins and 2- essential amino acids content of the protein fraction of the biomass. Extraction method

optimization of these proteins from the defatted biomass is currently under investigation (Gerde et al., 2013).

An important amount of data is actually available in the scientific literature concerning the propensity of certain microalgae strain to accumulate lipids upon nitrogen depletion in the culture medium (Breuer et al., 2012; Griffiths et al., 2012; Illman et al., 2000; Mayers et al., 2013; Shifrin & Chisholm, 1981). During such an accumulation phase, when the lipid proportion of the biomass increases, this is done at the expense of the protein and/or carbohydrate cellular contents. Interestingly, it was observed that one or the other could be preferentially converted into lipids depending on the microalgae strain (Williams & Laurens, 2010). Unfortunately, no general trend related to species from the same phylum could be defined until now, and an evaluation needs to be done for each specie. Information about biochemical composition after a physiological stress induced by nitrogen starvation was therefore collected from the literature and presented in a triangular graph (Figure 3.2). It can be observed that most strain accumulated lipids at the expense of the protein fraction of the biomass. This is mainly related to the decrease in protein and chlorophyll synthesis in the absence of a nitrogen source (Breuer et al., 2012). This phenomenon is responsible for the reduction of the growth rate typically observed during the lipid accumulation stage. Therefore, in a microalgal biodiesel production process where proteins should be the secondary commercial product, the lipid accumulation phase, if necessary, should be triggered by other means than nitrogen starvation. Indeed, various other culture conditions, such as temperature, osmotic pressure, illumination conditions and nutrition mode, are also known to modulate the biochemical composition of microalgae (Li et al., 2010; Li et al., 2011; Liu et al., 2008; Oh et al., 2009; Salama et al., 2013).

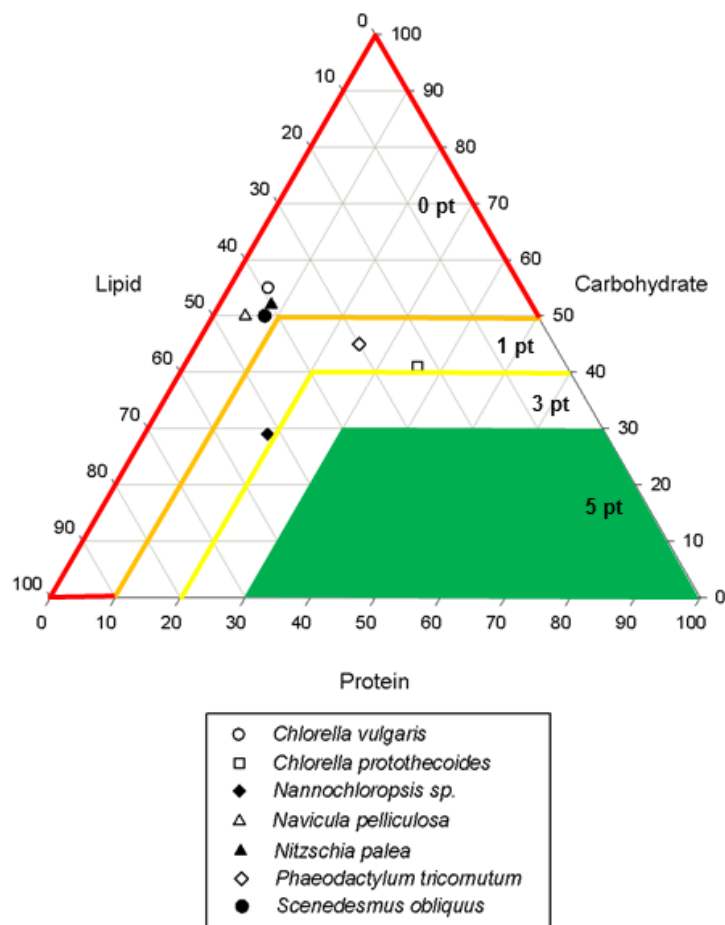


Figure 3.2 Triangular graph showing the proportions (%) of lipids, proteins and carbohydrates in the biomass of 7 of the 10 preselected strains after nitrogen starvation.

Evaluation of the essential amino acids content of the protein fraction of the biomass was made using the essential amino acids index (EAAI) (Becker, 1994). This method is based on the assumption that the biological value of a protein is a function of the level of all the essential amino acids in relation to their content in a reference protein (egg). The test performed here considered the nine following essential amino acids: lysine, valine, isoleucine, leucine, threonine, phenylalanine, methionine and cysteine (as one), arginine and histidine. Amino acid profiles were obtained from the available literature (Becker, 1994; Brown, 1991; Daume et al., 2003; Habib et al., 2004; Pyle, 2008; Wei et al., 2011) and EAAI was calculated according to the following equation:

$$EAA = \sqrt[9]{(lys_{test}/lys_{ref} \times val_{test}/val_{ref} \dots \times his_{test}/his_{ref})}$$

where “test” is the amount of the particular amino acid, as percentage of total amino acids, found in the literature for each strain, and “ref” is the one of the reference protein. *S. limacinum* and *N. pelliculosa* presented the highest EAAI (>0.9) because of fair proportions of methionine and cysteine which are generally not very present in microalgal proteins (Becker, 1994).

3.3.6 Criterion C: Adaptation to cultivation system (bioreactors)

Despite their higher initial construction costs, bioreactors offer many advantages over open pond systems such as lower evaporation rates and contamination risks as well as higher productivity rates and better control over various culture parameters and, consequently, over the quality of the end product (Jorquera et al., 2010; Norsker et al., 2011). Microalgae species to be cultivated in bioreactors should have high resistance to shear stress as vigorous agitation is often necessary in order to prevent gas buildup in the culture medium, and ensure homogeneous culturing conditions so the whole process operates at optimal conditions.

Evaluation of this resistance can be made by measuring the photosynthetic activity at different tip speed (Leupold et al., 2012) or determining the effect of shear force on growth and viability of the organism (Chisti & Flickinger, 2009). In all cases, key morphological and physiological cell characteristics greatly influence the tolerance to shear stress and small cell sizes and robust cell walls are normally favored (Table 3.4). However, these parameters can also greatly affect the efficiency of the lipid extraction method (see section 3.3.4). Also, strains forming large colonies are not fit for cultivation in bioreactors as they are more likely to produce biofilms and thus foul the systems. Therefore, benthic strains such as *N. pelliculosa* and *N. palea* were not considered good candidates for cultivation in bioreactors, whereas thick walled small *N. oculata*, *Chlorella* spp. and *Scenedesmus* spp. obtained the highest score.

Table 3.4 Experimental determination of culture parameters used to determine lipid and triglycerides (TAG) productivity of the 10 pre-selected strains. (DCW = Dry cells weight)

	Duration of culture (days)	Final cell concentration ($\times 10^6$ cells mL ⁻¹)	Biomass yield (g L ⁻¹)	Lipid content (% DCW)	Lipid productivity (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	TAG content (% lipids)	TAG productivity (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
Ac	9	49 ± 9	0.63 ± 0.16	35 ± 11	25	20 ± 2	5
Cp	8	37 ± 2	0.40 ± 0.08	26 ± 7	13	9 ± 2	1
Cv	14	38 ± 2	0.45 ± 0.02	39 ± 6	12	19 ± 7	2
No	10	138 ± 3	0.44 ± 0.06	48 ± 11	21	79 ± 2	17
Na	9	6 ± 1	0.33 ± 0.08	6 ± 2	2	31 ± 8	< 1
Ni	10	7 ± 1	0.13 ± 0.01	25 ± 3	3	70 ± 1	2
Pt	10	9 ± 1	0.62 ± 0.06	23 ± 2	15	77 ± 4	12
Sa	8	14 ± 1	0.26 ± 0.01	49 ± 6	16	35 ± 12	6
So	14	20 ± 3	0.37 ± 0.05	62 ± 11	16	37 ± 13	6
Sl	10	51 ± 6	0.84 ± 0.17	2 ± 1	2	16 ± 5	< 1

3.3.7 Criterion D: Susceptibility to harvesting and extraction methods (natural settling - critical CO₂)

For the “settling potential” and the “susceptibility to supercritical fluid extraction (SFE)” indicators, the data used for the classification of strains was collected from the available literature on the subject (Griffiths et al., 2012; Halim et al., 2012; Levine et al., 2010; Mercer & Armenta, 2011; Wiltshire et al., 2000). Small size of the microalgal cells and high density of the aqueous broth can make harvesting of biomass an energy intensive stage (Molina Grima et al., 2003). Microalgae can be harvested by sedimentation, flotation, filtration and centrifugation (Gong & Jiang, 2011). According to the Stokes equation, the velocity (v) of free fall of a particle in an undisturbed gravitational field is given by:

$$v = 2gr^2 \Delta\rho / 9\eta \quad (\text{Myers, 1999})$$

Thus, the separation efficiency of a system can theoretically be improved by: i) increasing the diameter (r) of the cells, ii) increasing the difference in density ($\Delta\rho$) of the cells vs broth, iii) decreasing the viscosity (η) of the broth and, iv) replacing the force of gravity (g) by a centrifugal force. Therefore, large microalgae cells (Table 3.5) will be generally harvested faster, and with less energy consumption. On the other hand, Griffiths et al. (2012) demonstrated that natural settling potential could be evaluated by measuring the percentage of biomass recovery after 24h of decantation. One important observation is that nitrogen starved cultures with higher lipid content had lower settling potential than their nutrient replete counterparts. *S. limacinum* and the diatoms *N. palea* and *N. pelliculosa* obtained the highest scores because of a large cell size and propensity to form aggregates, respectively.

Table 3.5 Key morphological and physiological cell characteristics of the preselected strains.

Specie	Phyllum	Class	Cell characteristics		
			Size	Shape	Wall
Ac	Chlorophyta	Chlorophyceae	length: 1 - 2 μm , width: 4 - 5 μm	Elongated	Cellulose
Sa	Chlorophyta	Chlorophyceae	length: 2 - 4 μm , width: 5 - 10 μm	Elongated	Cellulose
So	Chlorophyta	Chlorophyceae	length: 2 - 4 μm , width: 5 - 10 μm	Elongated	Cellulose
Cp	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	2 - 6 μm	Spherical	Cellulose
Cv	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	5 μm	Spherical	Cellulose
Na	Heterokonta	Bacillariophyceae	length: 50 - 70 μm , width: 5 - 10 μm	Narrow linear	Silicious
Ni	Heterokonta	Bacillariophyceae	length: 50 - 70 μm , width: 5 - 10 μm	Narrow linear	Silicious
Pt	Heterokonta	Bacillariophyceae	length: 18 - 26 μm , width: 2 - 3 μm	Narrow linear	Silicious
No	Heterokonta	Eustigmatophyceae	1 - 2 μm	Spherical	Cellulose
Sl	Heterokonta	Thraustochytriaceae	7 - 15 μm	Spherical	Theque

(Bold & Wynne, 1985; Honda et al., 1998; Pan et al., 1996; Richmond, 2008; Wehr et al., 2002)

Conventional lipid extraction methods using organic solvents involve drying the biomass. This step constitutes the most energy intensive step of an eventual microalgal biodiesel industry in life-cycle analysis (Lardon et al., 2009; Sander & Murthy, 2010). Using solvent method at a large scale also requires additional energy input because the extracted lipids and solvent need to be separated by distillation (Gong & Jiang, 2011). In the present case study, the use of solvents would trigger the necessity for toxicology tests before the proteins could be considered as human or animal feed (Williams & Laurens, 2010).

SFE can operate in an aqueous medium and recuperation of the product could be done by flotation without toxic method associated. Due to its non-polar behaviour, CO₂ is a bad solvent for polar compounds. CO₂ is highly selective for non-polar lipophilic compounds like neutral lipids (Martinez, 2007). Cells crushing is therefore important as the cell wall is structurally composed of polar molecules which makes difficult the extraction of the internal compounds by supercritical CO₂ (Mendes et al., 2003). Lipids recovery efficiency can thus be improved by up to 3-4 times by disrupting the cells. Unfortunately, with the thick cellulosic cell wall (Table 3.5), some of the most promising microalgae for biodiesel production, such as *Nannochloropsis* spp. and *Chlorella* spp. are difficult to rupture using industrially relevant cell disruption methods such as high pressure homogenization (Horst et al., 2012). On the other hand, diatom with a fully silicified cell wall might offer a positive resistance to mechanical disruption methods and increase the cellular rupture efficiency of such methods (Lee et al., 2012).

3.3.8 Criterion E: Potential for process improvement (genetic engineering – mixo/heterotrophy)

Genetic engineering is becoming more common in microalgae and for some species of commercial interest such as *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis gaditana* and *Scenedesmus obliquus* optimized transformation methods are already available in the literature (Cha et al., 2012; Guo et al., 2013; Kindle, 1990; Radakovits et al., 2012; Zaslavskaya et al., 2000). In most cases, these manipulations aim at introducing a gene encoding for a protein of interest for the biopharmaceutical field; or an enzyme involved in the biosynthetic pathway of a compound to

modulate its productivity or its quality. The method most frequently used are electroporation and transfection by means of the bacterium *Agrobacterium tumefaciens*, but other techniques, such as particle bombardment and glass beads, have also shown some potential (Kirchmayr & Griesbeck, 2012). Some critical factors to consider are: 1 - the specificity of the microalgal genetic code, 2 - the choice of promoter sequences for optimal expression of the transgene, and 3 - the design of UTR sequences that evade negative regulatory mechanisms (Gimpel et al., 2013). Moreover, some interesting developments in our capacity to manipulate the microalgal chloroplastic and nuclear genomes may arise from the emerging field of synthetic biology (Georgianna & Mayfield, 2012; Gibson et al., 2010; O'Neill et al., 2012).

Mixo/heterotroph strains present the advantage to use one or many dissolved organic (DOC) carbon source to grow. In many cases, the presence of such DOC source allow increasing growth rate and biomass density, but it also considerably increases the risks of contamination by other microorganisms (Perez-Garcia et al., 2011b). Also, at the industrial scale, the costs associated with the DOC source can limit the potential of profitability of the whole process. Therefore, the potential to grow in mixo/heterotrophy on affordable DOC sources was evaluated according to the ability of a given strain to use a diversity of affordable and largely available DOC sources (Table 3.6). The *Scenedesmus* spp. and *Chlorella* spp. are the most studied for their potential for phycoremediation and use of various DOC sources.

3.3.9 Criterion F: Environmental considerations

Industrial scale microalgae cultivation imply the evaluation of associated environmental impacts (Mercer & Armenta, 2011). Indigenous strain isolation from a given potential site present advantages such as adaptation of the strain to its environment and lower risk of new (potentially invasive) specie introduction in the ecosystem.

Table 3.6 Diversity of industrial wastewaters and affordable residual matters that can serve as DOC source for growth.

	DOC source	Reference
Ac	Sodium acetate	(Chu et al., 1995)
Cp	Corn powder hydrolysate; sweet sorghum, glycerol, sodium acetate	(Gao et al., 2010; Heredia-Arroyo et al., 2010; Xu et al., 2006)
Cv	Brewery wastewater, Wheat bran, dry-grind ethanol thin stillage, soy whey, sodium acetate, lactate, glutamate, glycerol	(El-Sheekh et al., 2012; Farooq et al., 2013; Heredia-Arroyo et al., 2010; Lee, 2001; Liang et al., 2009; Mitra et al., 2012; Perez-Garcia et al., 2011a)
No		
Na	Glycerol	(Perez-Garcia et al., 2011b)
Ni		
Pt	Glycerol	
Sa	Cheese whey, sugarcane molasses	(Girard et al., 2014; Shamala et al., 1982)
So	Cheese whey; wheat bran; sodium acetate, Olive-oil mill wastewater, poultry litter, fish pond discharges, municipal secondary settling tank	(Combres et al., 1994a; El-Sheekh et al., 2012; Girard et al., 2014; Hodaifa et al., 2009; Mandal & Mallick, 2011)
Sl	Glycerol, sweet sorghum	(Ethier et al., 2011; Liang et al., 2010)

Table 3.7 Scores attributed to each preselected strains for each indicators of the six selection criteria.

Criteria	Indicators	Ac	Cp	Cv	No	Na	Ni	Pt	Sa	So	Sl
A. Productivity and quality of the main product (biodiesel)	1. TAG productivity	1.5	0.3	0.6	5	0	0.6	3.5	1.8	1.8	0
	2. Fatty acid profile	1	0	1	1	3	3	1	3	3	0
B. Productivity and quality of the secondary product (proteins)	1. Protein productivity	-	1	0	1	0	0	1	-	0	-
	2. Essential amino acids content	0	2	3	3.7	4.1	-	3.4	-	3	4.3
C. Adaptation to cultivation system (bioreactors)	1. Shear stress tolerance	5	5	5	5	0	0	0	5	5	0
	2. Biofilm and aggregate production	5	5	5	5	0	0	5	5	5	5
D. Susceptibility to harvesting and extraction methods (natural settling - critical CO₂)	1. Settling potential	2.7	1.3	1.3	3	5	5	2.1	4.3	4.3	5
	2. Susceptibility to SFE	0	0	0	0	5	5	5	0	0	2.5
E. Potential for process improvements (genetic engineering mixo/heterotrophy)	1. Potential for genetic engineering	0	5	5	5	0	0	5	5	5	0
	2. Affordable DOC source	1	4	5	0	1	0	1	2	5	2
F. Environmental considerations	1. Indigenous species	2.5	0	0	0	2.5	2.5	0	5	0	0
	2. Toxin production	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

However, it involves time-consuming lab work (3 – 6 months). Genetic engineering also raises some environmental considerations (Enzing et al., 2012). Provenance of the preselected strains was evaluated according to information provided by the culture collection. Also, some microalgae species can produce toxins. For example, some *Pseudo-nitzschia* can produce domoic acid, the neurotoxin that causes amnesic shellfish poisoning (Pan et al., 1996). These toxins are highly undesirable as they would contaminate the water used as growth medium and thus pose a potential threat to the environment. None of the strains evaluated here are known to produce toxins.

3.3.10 Relative importance of each criteria and final classification

The last step of the MSSP consists in determining the relative importance (or weight) of each criterion using the Ulrich method (Ulrich & Eppinger, 2007). This part of the process is somewhat subjective and for a similar set of criteria/indicators, the results might vary from one user to the other. However, it allows the users to consider qualitative, circumstantial or other aspects, which should influence the outcome of the MSSP, and could not be considered otherwise such as: i) the current commercial value of the primary or secondary product; ii) flexibility in the choice of the production system, harvesting method or extraction technology to be used or, iii) short to long term plans for the process improvement strategies. Table 3.8 presents an example of the matrix that was filled by our team for a particular given context. The scores obtained by each strain for each criterion are then proportionated using their respective weight (%). Table 3.9 presents final scores and classification of strains. In our case, *S. obliquus* ranked first and this result is in line with recent studies showing the high potential of this species for biodiesel production (Breuer et al., 2012; Griffiths et al., 2012; Mandal & Mallick, 2009).

Table 3.8 Relative importance of each criterion.

	A	B	C	D	E	F	Total	Weight %
A	X	5	4	4	5	3	21	23
B	2	X	3	3	4	3	15	16
C	3	3	X	3	5	3	17	18
D	2	2	3	X	4	3	14	15
E	1	2	2	2	X	3	10	11
F	3	3	3	3	3	X	15	16
						Total:	92	100

5 - Much more important

4 - More important

3 - Equal importance

2 - Less important

1 - Much less important

Table 3.9 Final scores and classification.

Strain	Final score /60	Final position
So	40.0	1
Sa	38.6	2
No	36.6	3
Pt	33.6	4
Cv	32.9	5
Cp	30.0	6
Na	25.4	7
Ac	25.0	8
Sl	23.3	9
Ni	21.2	10

3.4 Conclusion

In conclusion, the multi-criteria MSSP presented here allows including a large number of parameters into the selection process, therefore optimizing the outcome of the procedure while also shedding light on certain aspect of the selected strain and points to be addressed in a particular geographical and technical context. This procedure could easily be used for the selection of microalgae strains for different commercial applications. Users of this MSSP should however keep in mind the incertitude brought in when using data collected from the literature as growth kinetics and biochemical compositions can greatly vary depending on culture conditions and even provenance of the particular strain. Therefore, depending on time and resources available, most critical indicators should be determined empirically.

CHAPITRE 4 Culture mixotrophe de l'algue verte *Scenedesmus obliquus* en présence de perméat de lactosérum pour la production de biodiesel

Avant-propos

Auteurs et affiliation :

Jean-Michel Girard : étudiant au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Marie-Laine Roy : étudiante à la maîtrise, Département de biologie, chimie et géographie, Université du Québec à Rimouski

Mhammed Ben Hafsa : étudiant à la maîtrise, Département de biologie, chimie et géographie, Université du Québec à Rimouski

Jonathan Gagnon : professeur, Département de biologie, chimie et géographie, Université du Québec à Rimouski

Nathalie Fauchoux : professeure, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Michèle Heitz : professeure, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Réjean Tremblay : professeur, Institut des Sciences de la Mer, Rimouski (Qc).

Jean-Sébastien Deschênes : professeur, Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski.

Date d'acceptation :

17 mars 2014

État de l'acceptation :

Version finale publiée

Revue :

Algal Research, 5(0), 241-248

Référence :

(Girard et al., 2014)

Titre français :

Culture mixotrophe de l'algue verte *Scenedesmus obliquus* en présence de perméat de lactosérum pour la production de biodiesel

Contribution au document :

Cet article contribue à la thèse en exposant d'abord en détail la justification du choix du perméat de lactosérum comme source de DOC pour la culture de microalgues mixo/hétérotrophe à grande échelle. Par la suite, la particularité de deux espèces de microalgues du genre *Scenedesmus* de pouvoir utiliser le lactose comme source de DOC en conditions hétérotrophes, contrairement à deux espèces du genre *Chlorella*, est mise en lumière pour la première fois. Différents paramètres de culture et de mise à l'échelle du procédé, tels que la détermination de la proportion optimale de perméat de lactosérum à intégrer au milieu de culture ainsi que l'effet du mode nutritif sur la productivité et le profil lipidique de cultures de *S. obliquus* sont également testés à l'échelle laboratoire.

Résumé français :

L'élaboration de stratégies de culture de masse de microalgues oléagineuses à faible coût est une étape clé pour le développement de la prochaine génération de biocarburants. Dans le présent travail, nous proposons une stratégie basée sur l'utilisation du perméat de lactosérum (WP) comme source de carbone organique dissous (DOC) pour la culture mixotrophe de microalgues. D'abord, nous démontrons que le lactose pur, principal constituant du WP (> 80 % des solides dissouts totaux), peut soutenir la croissance de *Scenedesmus* spp. dans des conditions de culture hétérotrophe (absence de lumière). La substitution de 40% (v/v) du milieu de culture avec le WP a permis de stimuler considérablement la croissance de *S. obliquus* en mixotrophie ($\mu_{\max} = 1,083 \pm 0,030 \text{ j}^{-1}$) et en hétérotrophie ($\mu_{\max} = 0,702 \pm 0,025 \text{ j}^{-1}$) comparativement aux cultures témoins photoautotrophes ($\mu_{\max} = 0,267 \pm 0,083 \text{ j}^{-1}$). Une réduction significative de la concentration en lactose a été observée au cours de la croissance, tandis que les concentrations de galactose et de glucose ont augmenté dans le milieu de culture. Enfin, des analyses ioniques du milieu de culture ont montré l'épuisement de l'azote extracellulaire (nitrate et ammonium), tandis que les analyses lipidiques ont montré une accumulation de lipides neutres (NL) accompagnée d'une augmentation du pH (> 9,5) seulement en conditions photoautotrophes. Une méthode simple et rapide pour l'estimation du contenu cellulaire en NL est également décrite.

Mixotrophic Cultivation of Green Microalgae *Scenedesmus obliquus* on Cheese Whey Permeate for Biodiesel Production

*Jean-Michel Girard^{1,3,4}, Marie-Laine Roy², Mhammed Ben Hafsa², Jonathan Gagnon²,
Nathalie Faucheux¹, Michèle Heitz¹, Réjean Tremblay³, Jean-Sébastien Deschênes⁴*

¹ Département de Génie Chimique et Génie Biotechnologique, Université de Sherbrooke
2500, boul. de l'Université, Sherbrooke (Québec) Canada, J1K 2R1;

²Département de biologie, chimie et géographie, Université du Québec à Rimouski, 300, allée
des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1;

³Institut des Sciences de la Mer,
310, allée des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1;

⁴Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski, 300,
allée des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1;

Abstract

Microalgae mass cultivation for biodiesel production might very well become the next marketable biofuel. The main challenge to overcome however is the development of high efficiency strategies for the large-scale production of oleaginous microalgae at low costs. In the present work, the use of cheese whey permeate (WP) in mixotrophic microalgae cultures is proposed. Pure lactose, the main constituent of WP (>80% w/w of the total dissolved solids), can support *Scenedesmus* growth under heterotrophic culture conditions (absence of light). Substituting 40% (v/v) of the culture medium with WP significantly stimulates *Scenedesmus obliquus* growth under mixotrophic ($\mu_{\max} = 1.083 \pm 0.030 \text{ day}^{-1}$) and heterotrophic ($\mu_{\max} = 0.702 \pm 0.025 \text{ day}^{-1}$) conditions, compared to photoautotrophic control cultures ($\mu_{\max} = 0.267 \pm 0.083 \text{ day}^{-1}$). As growth occurs in the presence of lactose, a significant reduction of its concentration is observed, while the galactose and glucose concentrations actually increase in the culture medium. Culture medium analyses showed complete exhaustion of extracellular nitrogen (nitrate and ammonium), while intracellular lipid analyses showed neutral lipid (NL) accumulation, particularly under conditions of high pH (>9.5). Photoautotrophic control cultures accumulated more lipids (per dry weight) than WP-supplemented cultures, an aspect which is discussed in the context of lipid enrichment strategies. A fast and simple method for NL cellular content estimation is also described.

Keywords: Microalgae, Mixotrophy, Lactose, Whey permeate, Biodiesel, Neutral lipid content estimation

4.1 Introduction

Microalgae are largely under investigation for their ability to produce oils for a variety of markets (Spolaore et al., 2006). Marine species usually contain large amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and are often good candidates for the production of the following ω -3 fatty acids: arachidonic acid (ARA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) for the aquaculture and human food supplement industry (Khozin-Goldberg et al., 2011). Freshwater species, on their behalf, mainly accumulate saturated fatty acids (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA). These can often be transformed into high quality biodiesel or even jet fuel (Mata et al., 2010). In particular, triglycerides (TAG) are a class of neutral lipids (NL) that can be converted into fatty acid methyl esters (FAME) through transesterification, a catalytic reaction that involve alcohols (Peterson et al., 1991; Ramos et al., 2009). FAME is a source of biodiesel compatible with most conventional diesel engines, thus could readily replace fossil diesel sources. However, the high costs of microalgae production still hinder the advent of this product (Wijffels & Barbosa, 2010).

A significant advantage of microalgae-produced biodiesel is that it limits the net amount of carbon dioxide (CO₂) emitted into the atmosphere (Williams & Laurens, 2010). This advantage has yet to be supported by more efficient industrial processes allowing the production of large amounts of microalgal biomass at lower costs. Mixotrophic growth, for some microalgae species, can significantly improve biomass productivity (acting on both the maximum cell density and growth rate), thus lowering the production costs (Bhatnagar et al., 2011; Santos et al., 2011). In this nutrition mode, the microalgae may assimilate different dissolved organic carbon (DOC) sources in addition to the inorganic carbon (CO₂) fixed through photosynthesis (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004). For example, a 10-fold increase in EPA productivity has been observed under mixotrophic conditions (glycerol as the DOC source) with the marine diatom *Phaedactylum tricornutum* (Ceron-Garcia et al., 2000). Glucose is also often used as a carbon source for mixotrophic cultivation of various microalgae as it is easy to assimilate: numerous microalgae species including *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella protothecoides* can grow on this substrate (Abeliovich & Weisman,

1978; Heredia-Arroyo et al., 2010). Although its use is pertinent for research, this DOC source would however be too expensive to depend on for an actual (economically viable) biodiesel production process.

The present work therefore investigates the possibility of integrating microalgae biomass production into an existing industrial production cycle: the dairy products industry. While microalgae can help eliminate phosphorus, nitrogen and sugars from different industrial effluents, the equipment and expertise already available on site (in most dairy product factories) could readily be used for microalgae production. As of fundamental concern, mixo/heterotrophic culture conditions require good control of bacterial populations (Verma et al., 2010), thus it is necessary to pre-process the DOC source. In a cheese factory for example, large amounts of whey are produced and passed through ultrafiltration devices to separate the proteins from other constituents, leaving mainly lactose. The costs of this ultrafiltration step are well compensated by the high-value of the whey proteins on the human food supplement market ($\sim 30\$ \text{ kg}^{-1}$ dry weight). The remaining lactose concentrate (or whey permeate, WP), is likewise free of contamination and could readily be used as a source of carbon (plus other nutrients) for microorganism cultivation. Presently, WP is often used directly for livestock feed without significant profit, or on occasion dried by a rather energy consuming process to produce lactose powder with low market value (Prazeres et al., 2012). As the number of people subject to lactose intolerance increases, the demand for such a product seems an unlikely growth market. Therefore, the hypothesis whether the lactose-rich WP could serve as a DOC source for feeding microalgae in a biodiesel production process merits further investigation, complementarily to the work presented in (Luo et al., 2011; Silva et al., 2010).

To that end, as WP is mainly composed of lactose, the hypothesis whether pure lactose can support and/or stimulate growth of the *Scenedesmus* and *Chlorella* microalgae strains is first evaluated. These freshwater species are selected since they are known to exhibit endogenous β -galactosidase activity (Davies et al., 1994). They could also easily be produced as mass cultures and have good lipid profiles for biodiesel (Mandal & Mallick, 2009; Shen et al., 2010). The specific objectives of this the study are thus: 1) to select a microalgae strain capable to use lactose for growth, 2) to quantify the growth and lactose consumption rates by

microalgae in the presence of WP for both mixotrophic and heterotrophic conditions and 3) to analyze NL content and the fatty acids profile under culture conditions that emulate a realistic industrial (scaled-up) implementation.

4.2 Materiel and methods

4.2.1 Culture maintenance and medium

Scenedesmus obliquus and *Scenedesmus acutus* strains were obtained from the Canadian Phycological Culture Center in Waterloo, Canada (CPCC 5 and CPCC 10). The *Chlorella vulgaris* and *Chlorella protothecoides* strains were obtained from the University of Texas at Austin algae collection (UTEX 2714 and UTEX 255). All cultures were kept in heat sterilized (121°C, 15 min) Bold's Basal Medium (BBM), with an adjusted pH of 6.8 (Stein, 1973). For *C. protothecoides*, 1 g L⁻¹ of soy protein peptone (Sigma-Aldrich) was added to the medium (BBMP). All manipulations were done under sterile conditions in a laminar flow biological hood and axenic culture conditions were confirmed periodically, at least at the beginning and end of each culture as follows: samples were fixed with glutaraldehyde (0.1 % v/v) and analyzed using an Epic Altra flow cytometer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, BC, CA) fitted with a 488 nm laser operated at 15 mW under a flow rate of 60 microliters per minute. Data were analyzed with the Expo32 v.1.2b software (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Heterotrophic bacteria were quantified in diluted samples stained with SYBR Green I nucleic acid boulder (Molecular Probes Inc., OR, USA), and were separated according to their nucleic acid content (LNA and HNA for low and high nucleic acid, respectively) (Tremblay et al., 2009).

A concentrate of pure D-lactose monohydrate (Sigma-Aldrich) was prepared in BBM medium at 100 g L⁻¹, filtered on 0.2 µm syringe filters, and then diluted to the desired concentration before inoculation. Cheese WP was received from a dairy transformation plant in Quebec, Canada (shipped on ice). Upon reception, the pH of the WP was 6.2 ± 0.1 (Table 4.1). Neutralisation tests were performed with 1M NaOH and 1M Na₂CO₃ solutions, which led to the formation of a white precipitate possibly due to calcium phosphate precipitation. To avoid potential problems or influencing the results, no pH adjustments were further made to the WP

solution, which was used directly in the cultures while ensuring rigorous pH monitoring during experimentation. Natural lake water (LW) from the Lac-St-Jean (Latitude 48.4666 Longitude -71.8180; QC, Canada) was obtained, sampled on July 1st 2011, 30 m from the lakeside. All these solutions were filtered (0.2 μm filters) and stored at 4°C until further use. Detailed chemical analyses of each solution are provided in Table 4.1.

Table 4.1 Chemical characteristics of solutions used as medium broth. All values are means \pm SD (n=3).

Parameter	Cheese whey permeate (WP)	Bold's Basal Medium (BBM)	Natural Lake Water (LW)
pH	6.2 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1
Total sugars (g L⁻¹)	73.8 \pm 5.5	-	-
Lactose (g L⁻¹)	72.4 \pm 5.6	-	-
Galactose (g L⁻¹)	1.00 \pm 0.04	-	-
Glucose (g L⁻¹)	0.40 \pm 0.04	-	-
Anions (ppm)			
Chloride (Cl⁻)	2586 \pm 62	43 \pm 1	0
Nitrite (NO₂⁻)	0	0	0.30 \pm 0.42
Nitrate (NO₃⁻)	0	204 \pm 1	0
Phosphate (PO₄³⁻)	2364 \pm 66	191 \pm 1	0
Sulfate (SO₄²⁻)	302 \pm 32	41 \pm 1	0
Cations (ppm)			
Sodium (Na⁺)	1365 \pm 141	130 \pm 3	0.11 \pm 0.15
Ammonium (NH₄⁺)	194 \pm 22	0	0
Potassium (K⁺)	2525 \pm 172	90 \pm 1	1.70 \pm 0.22
Magnesium (Mg²⁺)	266 \pm 28	13 \pm 1	0.54 \pm 0.76
Calcium (Ca²⁺)	808 \pm 56	10 \pm 1	1.99 \pm 1.87

4.2.2 Experimental design

Erlenmeyer flasks were incubated on an orbital shaker at 120 rpm (C1 platform shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) under constant temperature (22.5°C) and light intensity of 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (when applicable), measured on the external surface of the flasks using a Q201 quantum radiometer (Macam Photometrics Ltd., Livingston, Scotland). The initial cellular concentration for each experiment was set to 1 x 10⁶ cells mL⁻¹ (day 0), using

manual cell counts on a haemocytometer. All experiments were performed in three replicates ($n = 3$).

4.2.3 Microalgae strain selection for lactose conversion

S. obliquus, *S. acutus*, *C. vulgaris* and *C. protothecoides* were grown in triplicate under heterotrophic conditions (continuous darkness) in 20 mL of sterile BBM (or BBMP for *C. protothecoides*) containing 5 g L⁻¹ D-lactose monohydrate in 50 mL Erlenmeyer flasks. Photoautotrophic control cultures were grown in identical conditions (also in triplicate), except for the absence of lactose in their culture medium. Samples were taken at days 6 and 13 post-inoculation to determine the cellular concentration through manual cell count using a haemocytometer.

4.2.4 WP use and growth optimization

Partial substitution of the BBM medium with WP in *S. obliquus* cultures was tested in various proportions (5, 10, 20, 40, 60 and 80% WP (v/v)) under mixotrophic conditions. Results showed increased growth up to 40% substitution (data not shown). Higher initial WP concentrations prompted a significantly longer lag phase, possibly due to substrate inhibition at low cell concentrations (Chen, 1996). Thus for the mixotrophic and heterotrophic treatments, 80 mL of sterile mixture (60% BBM and 40% WP v/v) were used in 250 mL Erlenmeyer flask for the experiments (13 days duration). Photoautotrophic treatment used 80 mL of sterile BBM only (no DOC source).

The photoautotrophic and mixotrophic cultures were kept under continuous illumination, while the heterotrophic cultures were kept in the dark. All experiments were performed in triplicate. Every day the cultures were sampled to monitor growth. Biomass concentration was estimated by measuring absorbance at 750 nm with a fixed wavelength DU640 UV-visible spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, BC, CA) in 1 cm test tubes. Cultures were diluted (1/10) with distilled water to keep readings in the interval 0 to 1.2. Biomass yield was analyzed using dry weight (DW) measurements. Cells were washed 3 times at 4°C with an equivalent volume of distilled water to get rid of excess sugars (centrifuged 5 min at 1500 g between each washing). Culture samples were then filtered on 24 mm glassfiber filter (GF/C,

Whatman Ltd, Maidstone, UK) and dried 24h at 70°C. A good linear regression fit was obtained (R^2 value of 0.9953) between the dry weight and absorbance measurements at 750 nm, which was observed for dry weights $\leq 2.0 \text{ g L}^{-1}$ and $\text{OD}_{750\text{nm}} \leq 0.5767$. Specific growth rate ($\mu \text{ d}^{-1}$) was calculated from the increase in cell density according to the equation $\mu = \ln(X_2/X_1) / (t_2 - t_1)$, where X is the biomass yield (g L^{-1}) and t is the time in units of days. Cultures were sampled at days 0, 3, 7, 10 and 13 for sugar and ion analyses.

4.2.5 Lipid enrichment

Lipid accumulation while growth occurs on WP was tested with different initial nitrogen levels (Table 4.1). *S. obliquus* was grown in triplicate on 150 mL of sterile BBM, BBM + WP (60% and 40% v/v, respectively) and LW + WP (60% and 40% v/v, respectively) media in 250 mL Erlenmeyer flasks. All cultures were kept in 16h: 8h light-dark regimes with air bubbling at an aeration rate of 0.3 L min^{-1} . Samples were taken at days 7 and 13 for growth and lipid analyses.

4.2.6 Analytical methods

Sugar analysis

Culture samples were centrifuged (1500 g, 5 min) and the supernatants were transferred in other tubes before freeze-drying. Lyophilized material was analyzed as described in (Girard et al., 2013) by GC-MS.

Ion analysis

Culture samples (1 mL) were centrifuged (10 000 g, 15 min) and the supernatant fraction was stored at -20°C until analysis. The analytical procedure was performed with an Ion Chromatography System (ICS-1000, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) equipped with a high-pressure isocratic pump and conductivity detector (DS6) set to 35°C. Volumes of 25 μL were injected. Cation analyses were performed with a security guard cartridge (IonPac CG12A $4 \times 50 \text{ mm}$) coupled to the analytical column (IonPac CS12A, $4 \times 250 \text{ mm}$). The eluent was 20 mM methylsulfonic acid and a flow rate of 1.0 mL min^{-1} was used throughout the analysis (15 min per run). Suppressor (CSRS Ultra II, 4 mm) current was set to 59 mA. Anion analyses were performed with a pre-column (IonPac AG14A, $4 \times 50 \text{ mm}$) coupled to the analytical

column (IonPac AS14A, 4 x 250 mm). An aqueous solution of 8 mM Na₂CO₃ and 1 mM NaHCO₃ was used as eluent at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. The total run time of each sample was 18 min. Suppressor (ASRS Ultra II, 4 mm) current was set to 45 mA. Calibration curves were used to quantify the major ions: sodium (Na⁺), potassium (K⁺), ammonium (NH₄⁺), magnesium (Mg²⁺), calcium (Ca²⁺), chloride (Cl⁻), nitrite (NO₂⁻), nitrate (NO₃⁻), phosphate (PO₄³⁻) and sulfate (SO₄²⁻), and all samples were diluted so their concentration would fall within the boundaries of these curves. The chromatograms were monitored and integrated by the Chromeleon® software version 6.8.

Intracellular lipid analysis

Culture samples were filtered on 24 mm glass-fiber filters (GF/C, Whatman Ltd, Maidstone, UK) and the lipids were extracted using a dichloromethane:methanol (2:1 v/v) solution, following the Folch procedure (Folch et al., 1957). Extracts were subdivided into two subsamples: one for fatty acids profile characterization on total lipids and the other for fatty acids characterization of NL (reserve lipids, mainly TAG) after separation from polar lipids (structural lipids, mainly phospholipids) by column chromatography on silica gel micro-columns (30×5 mm I.D. Kieselgel 70–230 mesh Merck) using chloroform: methanol (98:2, v/v) to elute NL (Marty et al., 1992). Fatty acid profiles were determined on FAME obtained by esterification using sulphuric acid:methanol (2:98, v/v) in toluene. FAME were concentrated in hexane before analysis by GC-MS (Thermo Fisher Scientific Inc., GC model Trace GC Ultra and MS model ITQ900) equipped with a Supelco Omegawax 250 capillary column (30 m × 250 µm × 0.25 µm film thickness). Initial oven temperature was 100°C for 2 min, then 140°C for 1 min and was increased at a rate of 10°C min⁻¹ until it reached 270°C. Injector temperature was 90°C and a constant helium flow of 1.0 mL min⁻¹ was used. Volumes of 1 µL were injected. Fatty acids (FA) were identified by comparing the retention times and mass spectrum with known standards (Supelco 37 Component FAME Mix; Supelco Inc., Belfonte, PA, USA) with the use of Xcalibur v.2.1 software (Thermo Fisher Scientific Inc., Mississauga, ON, CA).

4.2.7 Data analysis

For evaluating the ability of the microalgae strains to use lactose (Figure 4.1), the cellular concentrations obtained at day 13 were analyzed using Student's *t*-test. The effects of WP supplementation on *S. obliquus* growth (Figure 4.2 - A) were evaluated through mixed-model analyses of variance (ANOVA) performed on culture absorbance at 750 nm for all three trophic culture conditions (photoautotrophy, mixotrophy and heterotrophy). The results at two different time conditions (days 6 and 13) were used as repeated measures. Maximum specific growth rates ($\mu_{\max} \text{ d}^{-1}$) were evaluated by one way ANOVA with the trophic condition as treatment. Dissolved sugar contents of the culture media were analyzed by mixed-model ANOVA and the results obtained at two different time conditions (days 3 and 13) were used as repeated measures. Mixed-model ANOVA was also performed on the lipid enrichment results to evaluate the temporal variation (between days 7 and 13) in cellular total lipid content (mg g^{-1} dry weight), % saturated fatty acids (SFA), % monounsaturated fatty acids (MUFA), % polyunsaturated fatty acids (PUFA) and neutral lipids (NL) ratio to total lipids (TL) for the microalgae grown in three different medium formulations (BBM, BBM + WP, LW + WP). When variations were noted, *a posteriori* Student-Newman-Keuls (SNK) multiple comparison tests were conducted to determine whether the difference in the results was statistically significant. Normality was verified by a Shapiro-Wilk test. When necessary, data were log+1 or arcsine square-root (for % data) transformed to achieve homogeneity of variances. Analyses were carried out using SAS v.9.2 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.3 Results and discussion

4.3.1 Microalgae strain selection

Four microalgae strains (*Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus acutus*, *Chlorella vulgaris* and *Chlorella protothecoides*) were identified as potential candidates for WP conversion (mainly lactose), based on their endogenous β -galactosidase activity (Davies et al., 1994), their ability to accumulate high lipid contents and their well-adapted fatty acid profiles for biodiesel production (Gouveia & Oliveira, 2009; Mata et al., 2010). They were cultivated in the presence of pure D-lactose monohydrate under strict heterotrophic conditions for comparison. Results in Figure 4.1 clearly show that only the *Scenedesmus* strains were able to grow in the 5

g L⁻¹ pure lactose-supplemented medium: both cultures showed significant differences relative to their respective control cultures at day 13 of the experiment ($T_{(4)} = -8.66$, $p < 0.001$ and $T_{(4)} = -6.24$, $p = 0.003$, respectively). *S. obliquus* cultures reached the highest cellular concentrations ($25 \pm 4 \times 10^6$ cells mL⁻¹). To our knowledge, it is only the second time that lactose is shown to support *Scenedesmus*'s growth (Samejima & Myers, 1958). Similar utilization of lactose was observed in certain plant cell suspensions (Callebaut et al., 1990; Frick & Morley, 1995; Hérouart et al., 1991). Since *C. protothecoides* cannot assimilate nitrate (Huss et al., 2002), soy protein peptone was added to the BBM medium (BBMP) so it would support its growth in photoautotrophic conditions. In heterotrophic conditions, results showed that lactose did not support the growth of either of the *Chlorella* spp.: no significant difference has been observed between the controls and the lactose-supplemented cultures.

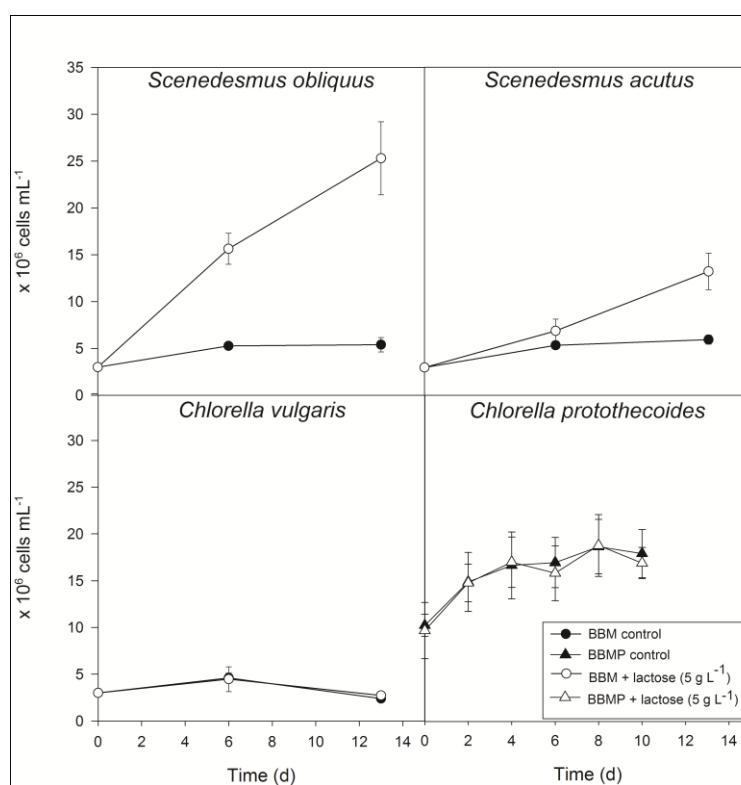


Figure 4.1 *S. obliquus*, *S. acutus* and *C. vulgaris* cultured in Bold's basal medium (BBM), and *C. protothecoides* cultured in BBM + 1 g L⁻¹ soy protein peptone (BBMP), were supplemented with 5 g L⁻¹ pure lactose under strict heterotrophic conditions (absence of light). Results are presented in cell concentration (x 10⁶) per mL and expressed as the mean±SD (n=3).

4.3.2 WP use and growth optimization

Substituting 40% (v/v) of BBM with WP led to important growth stimulation in *S. obliquus* cultures under both mixotrophic and heterotrophic conditions (Figure 4.2 - A). Culture growth was estimated using absorbance (at 750 nm) and dry weight measurements. Under mixo- and heterotrophic conditions, pH remained stable over the whole experiment at an average value of 6.4 ± 0.1 . Mixotrophic conditions induced rapid growth stimulation until day 6, after which it considerably slowed down to a somewhat stationary growth phase. Heterotrophic conditions induced moderate though sustained growth stimulation until day 13. At that time, absorbance measurements were 636% and 575% (respectively for the mixotrophic and heterotrophic conditions) that of photoautotrophic cultures. A significant interaction between time and treatments was observed ($F_{(2, 12)} = 387.30$, $p < 0.0001$).

Dry weight (DW) measurements were performed for the mixotrophic and heterotrophic WP supplemented cultures throughout the experiment. The highest biomass yield was obtained in mixotrophic conditions, $3.6 \pm 0.4 \text{ g L}^{-1}$ DW after 13 days, versus $2.7 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ DW (also after 13 days) for heterotrophic cultures. A linear regression was performed between DW and absorbance data (Figure 4.2 - B). Different linear relationships were obtained for biomass concentrations above and below 2 g L^{-1} . For this reason, only the values under 2 g L^{-1} were used for the linear regression equation. The correlation shift coincides with the decrease in growth observed from day 6 in the mixotrophic group. A similar phenomenon was also observed in *Haematococcus pluvialis* cultures in (Goksan et al., 2010), which was attributed to a change in the cellular state or cell contents due to variations in nutrient availability. These results further enforce the recommendation in (Griffiths et al., 2011) that correlating culture absorbance with dry weight (for standard curve generation) should only be done during the exponential and linear growth phases.

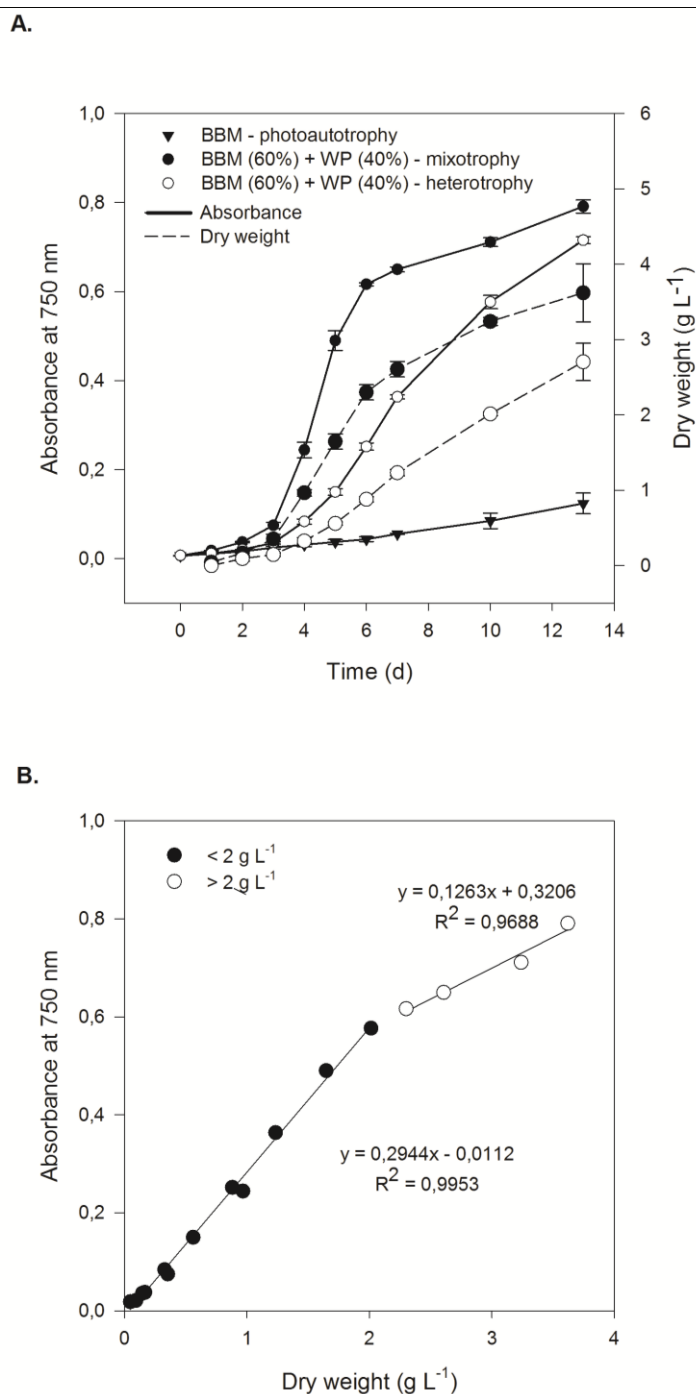


Figure 4.2 (A.) Absorbance at 750 nm and dry weight (DW) of *S. obliquus* cultures grown in photoautotrophy, mixotrophy or heterotrophy. For mixotrophic and heterotrophic conditions, 40% (v/v) of the Bold's basal medium (BBM) was substituted by cheese whey permeate (WP). Results are expressed as the mean \pm SD (n=3). (B.) Correlation between absorbance at 750 nm and dry weight for cultures $\leq 2 \text{ g L}^{-1}$ or $> 2 \text{ g L}^{-1}$. Results are expressed as the mean \pm SD (n=3).

In photoautotrophic BBM control cultures, the maximum specific growth rate (μ_{\max} d⁻¹) was reached at day 3 (0.267 ± 0.083), while it occurred at day 4 for both the mixotrophic (1.083 ± 0.030) and the heterotrophic (0.702 ± 0.025) groups. The mixotrophic conditions resulted in a significant increase of the growth rate ($F_{(2, 6)} = 179.94$, $p < 0.0001$), which is consistent with other results found on *S. obliquus* in mixotrophic conditions (and various other DOC sources) (Combres et al., 1994b; Hodaifa et al., 2009; Mandal & Mallick, 2009; Mandal & Mallick, 2011). Another interesting observation in this case is that the maximum growth rate (μ_{\max}) obtained in mixotrophic mode corresponds approximately to the sum of the maximum growth rates obtained in the photoautotrophic and heterotrophic modes ($\mu_{\text{mixo}} = \mu_{\text{photo}} + \mu_{\text{hetero}}$). Similar observations can be found in the literature with other microalgae species also: *Chlorella regularis*, *Chlorella vulgaris*, *Euglena gracilis*, *Haematococcus pluvialis* and *Spirulina platensis* (Ogbonna et al., 2002).

4.3.3 Lactose hydrolysis from WP by *S. obliquus*

Significant differences in the measurement of initial lactose concentration (at day 0) were observed between the two treatments (Figure 4.3 - A) despite an identical medium formulation. This could be due to 1) an incomplete solubilisation in the culture medium at the start of the experiment, 2) adsorption by freshly inoculated cells or 3) another phenomenon. Due to this unexplained difference, statistical significance of results in sugar concentrations was analyzed between days 3 and 13 of the experiment.

Significant differences attributable to the trophic conditions and times were observed for each individual sugar (galactose : $F_{(3, 4)} = 1133.4$, $p < 0.0001$; glucose : $F_{(3, 4)} = 872.6$, $p < 0.0001$; lactose : $F_{(3, 4)} = 31.19$, $p = 0.0031$). Heterotrophic conditions however showed no significant differences in lactose concentrations between days 3 and 13 ($p = 0.0603$). Also in this case, the glucose and galactose concentrations fell below the detection limit of the instrumentation between days 7 and 10 (Figure 4.3 - A), suggesting the monosaccharides were consumed by the microalgae.

Mixotrophic conditions showed a significant decrease in lactose concentration (-54.4%) between days 3 and 13 ($p = 0.001$). It was accompanied by an accumulation of galactose and glucose in the culture medium, suggesting extracellular hydrolysis of lactose. Such a phenomenon would make more glucose and galactose available to the cells (for growth),

though in this case these metabolites were mainly accumulated in the medium (up to 4.2 ± 0.1 g L⁻¹ for galactose and 3.5 ± 0.2 g L⁻¹ for glucose) while the onset of the stationary growth phase occurred (Figure 4.2 - A). Exhaustion of nitrogen (or other nutrient limitation) in the culture media would explain this occurrence (see section 3.2.2).

To assimilate lactose, living organisms have to synthesize a β -galactosidase enzyme to hydrolyze lactose into glucose and galactose and internalize the molecules through the adequate transmembrane proteins. In *Escherichia coli*, the *lac* operon is responsible for the expression and regulation of these enzymes as a function of lactose and glucose availability in its environment (Jacob & Monod, 1961). Certain plant and bacterial β -galactosidases can even be secreted outside the cell (Nie et al., 2013; Wen et al., 2008), resulting in a necessary internalization of the glucose and galactose molecules instead. In the microalgae *Chlorella kessleri*, transmembrane transporters HUP1 and HUP2 allow for this internalization to occur, but with different affinities for glucose and galactose (Stadler et al., 1995). Interestingly, some point mutations in the HUP1 gene (Q298N and N436Q) can modulate this affinity (Will et al., 1998). The ability of *S. obliquus* to grow on glucose suggests that a similar sugar transport mechanism is present in its genus (Mandal & Mallick, 2009). Although endogenous β -galactosidase activity has already been demonstrated in *S. obliquus* cultures (Davies et al., 1994), whether this enzyme can be secreted by these cells remains to be investigated.

Differences in lactose consumption rates between the mixo- and heterotrophic conditions may be explained by the different growth rates obtained. In both occasions, glucose and galactose began to accumulate as the biomass reached 2 g L⁻¹ DW (day 7 for mixotrophy and day 13 for heterotrophy) which corresponds to the onset of a stationary phase for the mixotrophic group (Figure 4.2 - A). Also, different patterns of gene expression and metabolic regulation under mixo- and heterotrophic culture conditions could be responsible for this result. For instance, light regulates various cellular metabolisms, such as photosynthesis and glycolytic pathways (Perez-Garcia et al., 2011c). For instance, it was shown that for *Chlorella sorokiniana* grown in the dark, the metabolic flux of glucose was mainly being routed (90%) through the pentose phosphate pathway (PPP), while only 10% was routed through the Embden-Meyerhof pathway (EMP). In the presence of light, the opposite was actually observed (EMP was the main glycolytic pathway) (Yang et al., 2000).

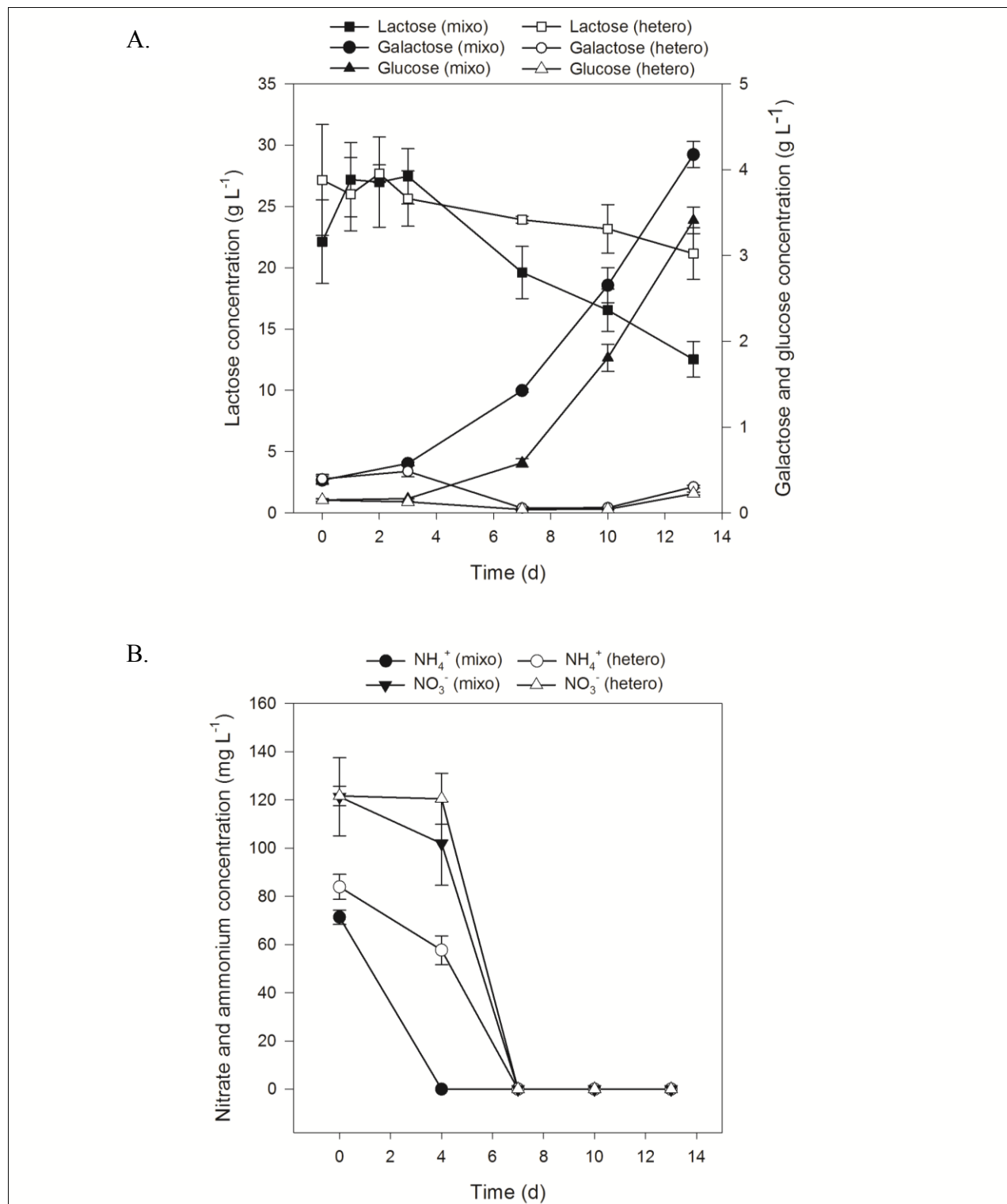


Figure 4.3 Lactose, galactose, glucose (A.) and nitrogen (B.) concentrations in *S. obliquus* cultures grown under mixotrophic or heterotrophic conditions with 40% (v/v) cheese whey permeate (WP) substitution of the culture medium (BBM). Results are expressed as the mean \pm SD (n=3).

4.3.4 Nitrogen depletion

The media was sampled at days 0 to 4, 7, 10 and 13 for major ion (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) analyses by ion chromatography. Nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) concentrations fell below the detection limit of the method (< 1 ppm) from day 7 of the experiment for both the mixotrophic and heterotrophic cultures (Figure 4.3 - B). Under mixotrophic conditions, NH_4^+ was consumed more rapidly, probably due to a faster growth rate. Since nitrogen depletion coincided with the end of the exponential growth phase, such evidence points toward this nutrient to be the limiting factor. In most microalgae cultures, total consumption of nitrogen from the culture media is necessary before significant lipid accumulation (mainly NL) occurs: thus, the design of an industrial application should carefully consider the biomass yields before introducing nitrogen deficiency conditions (Dean et al., 2010; Gardner et al., 2011; Ho et al., 2012).

4.3.5 Lipid enrichment

Several aspects of a realistic industrial implementation were considered in the design of this experiment. First, the culture volume in the shake-flasks was twice the usual volume, and an air bubbling system was added. The idea was to emulate the strategy used in larger tanks (with smaller surface-to-volume ratio) to avoid excessive CO_2 - O_2 accumulation (Chen et al., 2011). A light-dark cycle (16h: 8h) was also imposed to reduce the operation costs versus continuous illumination. Finally, the BBM medium formulation was replaced by natural lake water (LW) composition, sampled from a lake that could serve as water supply for large scale microalgae culturing.

Cultures were sampled during linear (day 7) and early stationary growth phases (day 13) for dry weight and lipid analyses. Table 4.2 presents the global NL and TL productivities ($\text{mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) at day 13 and biomass yields at days 7 and 13 for all three experimental conditions. Despite biomass yields 1.8 to 2.6 times higher, mixotrophic cultures resulted in lower NL productivities even when compared to the photoautotrophic control cultures. This is attributable to lower NL cellular contents at the time of the sampling (Table 4.3).

Table 4.2 Biomass yields at day 7 and day 13, and lipid productivity at day 13 of *S. obliquus* cultured in Bold's basal medium (BBM), BBM + 40% (v/v) whey permeate (WP) or lake water (LW) + 40% (v/v) whey permeate.

	Biomass yield (g L ⁻¹)		Lipid productivity (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	
	Day 7	Day 13	Total lipids	Neutral lipids
BBM	0.7 ± 0.1	1.9 ± 0.1	36.9 ± 1.0	31.2 ± 2.1
BBM + WP	2.6 ± 0.1	4.9 ± 0.2	37.8 ± 4.3	19.2 ± 1.8
LW + WP	1.9 ± 0.1	3.5 ± 0.1	28.3 ± 6.0	17.6 ± 4.5

Results are expressed as the mean ±SD (n=3).

Fatty acid profiles (TL and NL fractions) are presented in Table 4.3 for each treatment. At day 7, the presence of PUFA was dominant for all treatment conditions, with stearidonic acid (18:4 n-3) as the main one. The relative proportion of each fatty acid class changed with time and the presence of MUFA, with oleic acid (18:1 n-9) as the main component, became dominant at day 13, again in all three situations. This increase in oleic acid is the result of NL accumulation between days 7 and 13: oleic acid was the prominent fatty acid of the NL fraction and an increase in the NL/TL ratio was observed for all treatments over this time interval. This ratio even reached 0.85 ± 0.08 in the photoautotrophic BBM control cultures at day 13. These cultures also showed the highest TL accumulation (249 ± 10 mg g⁻¹ dry weight).

Differences in DOC and overall nutrient availability, growth stages, osmolality and pH could explain the more important NL accumulation in the photoautotrophic BBM control cultures than in WP supplemented cultures. As in section 3.2, the pH of these cultures remained stable over the whole experiment (6.1 ± 0.3) while in photoautotrophic cultures it raised rapidly to reach 9.7 ± 0.2 (in average) between days 7 and 13 of the experiment. High pH conditions combined with nitrogen deficiency have been known to induce TAG accumulation in *Scenedesmus* sp. (Gardner et al., 2011). Finally, higher NL accumulation was observed in LW + WP cultures (2.6 fold) compared to BBM + WP cultures (1.4 fold) between days 7 and 13 of the experiment. Lower initial nitrogen availability in LW could explain this difference.

Fatty acids profile analyses revealed good suitability of *S. obliquus*'s oil for biodiesel production. The enrichment in SFA and MUFA fractions observed between days 7 and 13 has been favorable to this end, as biodiesel produced from these classes of fatty acids has better physicochemical properties (particularly cetane number and oxidative stability) than when produced from PUFA (Ramos et al., 2009). About the global availability and potential of whey as a DOC source for microalgal biodiesel production, there is currently over 150 M tons of whey produced each year globally, of which 4.9% (w/w) is lactose (Smithers, 2008). According to the results obtained here, these sugars could yield between 3.5 and 7 M tons of microalgal biomass and between 50 and 500 M gallons of microalgal biodiesel annually.

4.3.6 NL cellular content estimation

Various methods are available to estimate NL cellular content (often expressed in mg g^{-1} DW). Nile Red Fluorescence is a widely used method which was proven successful with a good variety of microalgae species (Cooksey et al., 1987; da Silva et al., 2009; de la Jara et al., 2003). However, this method implies significant costs, time and manipulation, thus is not well adapted for industrial implementation. The NL cellular contents (Table 4.3) were therefore correlated with the culture absorbance at 540, 680 and 750 nm (Figure 4.4). The hypothesis is that for a given cell concentration, the difference in composition (lipids vs. proteins vs. carbohydrates) would result in different light absorption patterns, providing information that could be translated into an indication of the NL cellular content. Best correlation results ($R^2 = 0.82$) were obtained with log transformed data at 680 nm wavelength. Differences in cell size, shape and organization may also greatly influence the cell's absorption/light scattering patterns, especially at 750 nm where light scattering is predominant. A particularity of *S. obliquus* cells (which individual size can vary from 4 to 12 μm) is their common organization in groups of four cells (or in pairs) depending on the growth stage. Despite these important changes in physiological patterns, the NL content (in mg g^{-1} DW) was estimated with relatively good accuracy simply by measuring the absorbance of *S. obliquus* cultures at 680 nm and 750 nm ($R^2 = 0.78$). This suggests that the NL content is inversely correlated with the chlorophyll content, since chlorophyll *a* is known to absorb light at 680 nm (Kirk, (1994)). Whether this relation would be useful to estimate NL cellular content in other microalgae species is yet to be demonstrated.

Table 4.3 Total and neutral lipid fatty acid composition at day 7 and day 13 of *S. obliquus* cultures in BBM, BBM + 40% (v/v) whey permeate and lake water + 40% (v/v) whey permeate^A

Day	7			13			Statistical analysis
	BBM	BBM + WP	LW + WP	BBM	BBM + WP	LW + WP	
Total lipids (% molar)							
16:0	21.9 ± 0.4	22.1 ± 0.3	22.8 ± 1.1	23.6 ± 0.2	21.7 ± 0.2	23.0 ± 0.2	
18:0	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.2	
16:1	TR	5.0 ± 0.3	5.5 ± 0.7	2.0 ± 0.2	4.5 ± 0.4	5.8 ± 0.4	
17:1	2.5 ± 0.2	4.8 ± 0.4	7.1 ± 0.3	1.4 ± 0.1	3.7 ± 0.1	4.6 ± 0.3	
18:1 n-9	27.1 ± 5.2	25.2 ± 2.0	22.4 ± 1.6	43.9 ± 1.0	29.3 ± 0.5	28.7 ± 0.4	
18:2 n-6	8.8 ± 1.0	15.1 ± 1.5	18.7 ± 0.8	8.4 ± 0.8	17.4 ± 0.7	21.3 ± 0.4	
18:3 n-3	2.2 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	
18:4 n-3	34.4 ± 4.4	22.8 ± 0.2	19.4 ± 0.7	15.7 ± 0.2	17.7 ± 0.7	12.3 ± 0.5	
Sum SFAs	24.0 ± 0.5 ^c	24.5 ± 0.4 ^{bc}	24.9 ± 1.1 ^{bc}	26.4 ± 0.2 ^a	25.1 ± 0.3 ^b	26.1 ± 0.3 ^a	t*trt (F _(2, 12) = 4.17, p = 0.0421)
Sum MUFAs	30.2 ± 4.9 ^d	35.4 ± 1.4 ^c	35.3 ± 1.9 ^c	48.0 ± 0.9 ^a	38.0 ± 0.8 ^{bc}	39.5 ± 0.3 ^b	t*trt (F _(2, 12) = 20.64, p < 0.0001)
Sum PUFAs	45.8 ± 5.3 ^a	40.1 ± 1.6 ^b	39.7 ± 1.0 ^b	25.6 ± 1.1 ^d	36.9 ± 1.0 ^{bc}	34.4 ± 0.3 ^c	t*trt (F _(2, 12) = 23.26, p < 0.0001)

Neutral lipids (% molar)							
16:0	20.6 ± 1.6	19.8 ± 0.1	21.6 ± 1.2	19.2 ± 0.5	18.1 ± 0.7	19.1 ± 0.3	
18:0	2.1 ± 0.2	3.1 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.2 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.1 ± 0.1	
16:1	4.5 ± 2.9	2.4 ± 0.4	2.5 ± 1.4	1.5 ± 0.1	2.8 ± 0.7	4.1 ± 0.2	
17:1	0.9 ± 0.1	1.9 ± 0.3	3.6 ± 0.2	0.8 ± 0.1	2.0 ± 0.1	3.3 ± 0.1	
18:1 n-9	51.2 ± 2.5	48.1 ± 2.4	34.9 ± 2.2	58.0 ± 1.0	46.5 ± 0.8	36.8 ± 0.1	
18:2 n-6	4.8 ± 0.3	11.9 ± 1.8	20.1 ± 2.2	6.8 ± 0.6	16.1 ± 0.6	23.7 ± 0.3	
18:3 n-3	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1	
18:4 n-3	11.6 ± 0.4	8.9 ± 0.7	10.1 ± 0.2	9.3 ± 0.1	7.9 ± 0.3	7.5 ± 0.3	
Sum SFAs	24.1 ± 1.3	24.2 ± 0.6	26.2 ± 1.6	21.9 ± 0.5	22.6 ± 0.8	23.3 ± 0.4	t (F _(1, 12)) = 26.19, p = 0.0003); trt (F _(2, 12)) = 6.06, p = 0.0152)
Sum MUFAs	58.4 ± 1.2 ^b	53.6 ± 0.5 ^c	42.3 ± 1.5 ^e	61.1 ± 1.0 ^a	52.2 ± 0.4 ^c	44.7 ± 0.2 ^d	t*trt (F _(2, 12)) = 4.63, p = 0.0323)
Sum PUFAs	17.6 ± 0.4	22.2 ± 2.4	31.4 ± 2.3	16.9 ± 0.6	25.3 ± 0.4	31.9 ± 0.5	trt (F _(2, 12)) = 159.49, p < 0.0001)
Lipids (mg g⁻¹ dry biomass)							
Total lipids (TL)	109 ± 3 ^b	91 ± 7 ^{bc}	78 ± 1 ^c	249 ± 10 ^a	99 ± 7 ^b	105 ± 25 ^b	t*trt (F _(2, 12)) = 54.39, p < 0.0001)
Neutral lipids (NL)	46 ± 15 ^{bc}	36 ± 6 ^c	25 ± 4 ^c	211 ± 27 ^a	50 ± 4 ^{bc}	65 ± 18 ^b	t*trt (F _(2, 12)) = 44.52, p < 0.0001)
NL/TL	0.43 ± 0.14 ^{cd}	0.40 ± 0.04 ^{cd}	0.32 ± 0.05 ^d	0.85 ± 0.08 ^a	0.51 ± 0.04 ^{bc}	0.62 ± 0.06 ^b	t*trt (F _(2, 12)) = 6.25, p = 0.0138)

Results are expressed as the mean±SD (n=3). BBM : Bold's basal medium; LW : lake water; WP : whey permeate; SFA : saturated fatty acids; MUFA : monounsaturated fatty acids; PUFA : polyunsaturated fatty acids; T : time; trt : treatment; d.f. : degree of freedom

^A After mixed model repeated two-ways ANOVA, Student-Newman-Keuls (SNK) multiple comparison test results are arranged in decreasing order from left to right : a>b>c>d>e (effect of time (t) and treatment (trt), SNK test, P<0.05).

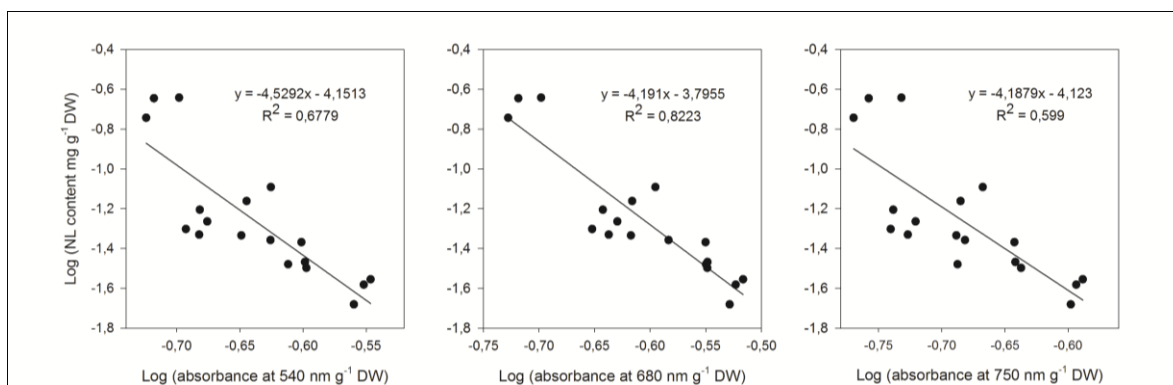


Figure 4.4 Linear regression relating log neutral lipid (NL) cellular content in mg g^{-1} DW with log absorbance of cultures g^{-1} DW at 540 nm (A.), 680 nm (B.), 750 nm (C.) and 680 nm – 750 nm (D.).

4.4 Conclusion

In conclusion, cheese whey permeate has been investigated as a potential DOC source for microalgae cultivation for biodiesel production. Evaluation of microalgae strains with an ability to use lactose for growth showed *S. obliquus* to be the most promising candidate. Substituting 40% (v/v) of the default culture medium (BBM) with WP resulted in higher specific growth rates and biomass yields under mixotrophic conditions than heterotrophic and photoautotrophic cultures. Mixotrophic growth allowed a 54.4% reduction in lactose concentration while during the stationary growth phase, an accumulation of glucose and galactose was observed in the culture medium, suggesting extracellular lactose hydrolysis by the microalgae. Future work is however necessary to optimize the biomass yields and lactose consumption, and determine the culture conditions that will allow increased NL productivity in *S. obliquus* WP supplemented cultures.

CHAPITRE 5 Modèles d'étalonnage FT-IR/ATR univarié et multivarié pour le suivi *in situ* des sucres dans un milieu complexe de culture de microalgues

Avant-propos

Auteurs et affiliation :

Jean-Michel Girard : étudiant au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Jean-Sébastien Deschênes : professeur, Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski.

Réjean Tremblay : professeur, Institut des Sciences de la Mer, Rimouski (Qc).

Jonathan Gagnon : professeur, Département de biologie, chimie et géographie, Université du Québec à Rimouski

Date d'acceptation :

25 juin 2013

État de l'acceptation :

Version finale publiée

Revue :

Bioresource Technology, 144(0), 664-668

Référence :

(Girard et al., 2013)

Titre français :

Modèles d'étalonnage FT-IR/ATR univarié et multivarié pour le suivi *in situ* des sucres dans un milieu complexe de culture de microalgues

Contribution au document :

Cet article contribue à la thèse en présentant une méthode innovatrice, simple et rapide pour effectuer le suivi des sucres dans un milieu de culture composé de perméat de lactosérum. Contrairement aux méthodes déjà existantes exploitant la spectrophotométrie infrarouge, la présente méthode permet de tenir compte du phénomène d'additivité des spectres. Cette méthode pourrait être utilisée dans un procédé de culture de microalgues à l'échelle industrielle ou encore à l'échelle laboratoire par exemple dans le cadre de travaux portant sur l'hydrolyse de polysaccharides par des cultures biologiques ou encore pour étudier la diauxie.

Résumé français :

L'objectif de ce travail est de développer une méthode rapide et simple pour le suivi *in situ* des sucres dans des cultures biologiques. Une nouvelle technologie basée sur la spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier couplée à une sonde externe composée d'un câble de fibre optique avec à son extrémité un cristal à réflectance totale atténuée (FT-IR/ATR) a été utilisée, d'abord pour construire des modèles prédictifs à partir de solutions de sucres purs, et ensuite afin d'utiliser ces modèles pour effectuer le suivi des sucres dans un milieu complexe de culture de microalgues mixotrophes. Les résultats de quantification du modèle univarié ont été corrélés avec la teneur en solides dissous totaux ($R^2 = 0,74$). Un modèle multivarié a également été développé après normalisation des données de calibration pour quantifier de manière proportionnelle les différents sucres présents dans le milieu de culture complexe. Ce modèle a montré une précision prédictive supérieure à 90% pour les sucres représentant plus de 20% du total. Ces travaux offrent une alternative aux méthodes de suivi des sucres classiques, et pourrait être utilisée pour un suivi *in situ* dans des systèmes de production à l'échelle commerciale.

**FT-IR/ATR Univariate and Multivariate Calibration Models for *in situ*
Monitoring of Sugars in Complex Microalgal Culture Media**

Jean-Michel Girard^{1,3,4}, Jean-Sébastien Deschênes³, Réjean Tremblay⁴, Jonathan
Gagnon²*

¹ Département de Génie Chimique et Génie Biotechnologique, Université de Sherbrooke
2500, boul. de l'Université, Sherbrooke (Québec) Canada, J1K 2R1;

² Département de biologie, chimie et géographie; Université du Québec à Rimouski,
300, allée des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1;

³ Département de mathématiques, informatique et génie; Université du Québec à Rimouski,
300, allée des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1;

⁴ Institut des Sciences de la Mer,
310, allée des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1

ABSTRACT

The objective of this work is to develop a quick and simple method for the *in situ* monitoring of sugars in biological cultures. A new technology based on Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared (FT-IR/ATR) spectroscopy in combination with an external light guiding fiber probe was tested, first to build predictive models from solutions of pure sugars, and secondly to use those models to monitor the sugars in the complex culture medium of mixotrophic microalgae. Quantification results from the univariate model were correlated with the total dissolved solids content ($R^2 = 0.74$). A vector normalized multivariate model was used to proportionally quantify the different sugars present in the complex culture medium and showed a predictive accuracy of > 90% for sugars representing > 20% of the total. This method offers an alternative to conventional sugar monitoring assays and could be used at-line or on-line in commercial scale production systems.

Keywords: FT-IR/ATR technology, microalgae, process monitoring, mixo/heterotrophy, PLS model

5.1 Introduction

Industrial microalgae cultivation for the production of valuable compounds has tremendous potential and offers many advantages over yeasts and bacteria. In particular, the endogenous ability of these photosynthetic microorganisms to produce high-value chemicals for pharmaceutical and biofuel applications (Spolaore et al., 2006). However, this potential is still largely under study and numerous cultivation processes are actually under development (Bumbak et al., 2011). Some of these processes include a mixo/heterotrophic cultivation stage where a dissolved organic carbon (DOC) source is added to the culture medium, in order to enhance productivity. Such DOC sources may even originate from municipal or industrial waste (phytoremediation) or from low-cost residual matters (Liang et al., 2010; Mitra et al., 2012). As in the case of other microbiological cultures, process operation and optimization are largely dependent on the availability of efficient analytical tools and monitoring methods, ultimately leading to industrial applications.

The methods currently available for the tracking of dissolved sugars during microbial cultivation, such as gas and liquid chromatography (GC and LC) or colorimetric methods are time and energy consuming. Moreover, none of these methods are readily applicable for the on-line monitoring of sugars in biological cultures. Infrared (IR) spectrophotometry presents a simple and quick alternative, particularly in combination with attenuated total reflectance (ATR) technology (Hashimoto & Kameoka, 2000). Until recently, this technology was limited to offline measurements, as the samples were to be taken from the culture and introduced in a compartment of the spectrometer before the quantification would be performed. The recent advent of external probes in combination with optic fibers (1 to 4.5 m in length) now makes it possible to monitor the fate of various analytes *in situ* during laboratory or industrial scale biological/chemical processes.

In our preliminary work, *Scenedesmus obliquus* cultures productivity was shown to be highly stimulated by the addition of cheese whey permeate (WP) in the culture medium.

WP is an abundant source of saccharides, mainly lactose (> 95%). Monosaccharides like galactose and glucose and other oligosaccharides (3-10 monomers) are also present in small amounts (less than 3% of total sugars) in bovine milk and whey (Barile et al., 2009). Such experimental conditions are thus well adapted to test the potential of FT-IR/ATR technology for sugars monitoring in microalgae cultures (Solis-Oba et al., 2011). Our specific objectives were to 1) determine whether the presence of living cells in the medium influences the readings of the ATR probe and 2) monitor the sugars in a mixotrophic microalgae culture using FT-IR/ATR spectroscopy. We tested the hypothesis that univariate and multivariate calibration models built from the spectra of pure sugar solutions could be used to monitor the sugar composition of a complex culture medium.

5.2 Materials and methods

5.2.1 FT-IR measurements

FT-IR absorbance spectra were acquired with a Bruker Matrix MF spectrometer equipped with an ATR diamond probe and a 1.5 m AgX optic fiber. All spectra were measured in the range between 4000-600 cm^{-1} , at resolution of 4 cm^{-1} and using 32 scans. Distilled water was used as background and to clean the diamond probe between each sample. All measurements were realized at room temperature. The data was treated with the OPUS 6.5 software.

5.2.2 Univariate calibration model

The calibration curve was realized using 8 different concentrations of pure D-lactose monohydrate dissolved in distilled water (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 g L^{-1}). Spectra were the average of three separate replicates ($n=3$). Quantification of the lactose concentration was done from the integration of the absorption bands 1186-933 cm^{-1} . Integration represents the area above a line drawn between the intensity values of the frequency limits specified.

5.2.3 Multivariate calibration model

Duplicate spectra of 46 aqueous standard solutions (Table 5.1) made from various mixtures of pure D-lactose, D-glucose and D-galactose (Sigma-Aldrich) were obtained with proportions varying from 0-100%, 0-50% and 0-50%, respectively. In these samples, the total sugar concentration was kept constant at 100 g L⁻¹. These spectra were used to build the partial least square (PLS-1) regression model (see section 3.2).

Table 5.1 Composition of the 46 aqueous solutions used to build the multivariate model. Total sugar concentration was kept constant at 100 g L⁻¹.

Sample	Lac%	Glu%	Gal%
1	38.00	42.50	19.50
2	67.89	2.66	29.45
3	72.64	11.94	15.42
4	26.50	24.50	49.00
5	42.71	47.24	10.05
6	23.00	38.00	39.00
7	70.77	29.11	0.12
8	46.56	49.06	4.38
9	47.10	9.30	43.60
10	28.00	28.50	43.50
11	73.60	3.37	23.03
12	64.30	4.80	30.90
13	79.91	16.98	3.11
14	16.00	34.50	49.50
15	29.50	46.50	24.00
16	50.50	21.00	28.50
17	30.00	39.00	31.00
18	48.45	9.10	42.45
19	82.98	16.00	1.03
20	27.00	31.50	41.50
21	29.00	42.00	29.00
22	78.39	9.63	11.98
23	57.00	28.00	15.00
24	50.00	37.00	13.00
25	32.50	26.50	41.00
26	86.00	8.01	5.99
27	25.37	47.26	27.36
28	70.15	12.94	16.92
29	39.50	25.00	35.50
30	62.22	0.15	37.63
31	26.63	40.20	33.17

32	69.49	24.50	6.01
33	65.55	28.52	5.92
34	74.40	0.13	25.47
35	50.50	13.50	36.00
36	23.50	35.50	41.00
37	26.87	45.77	27.36
38	69.58	20.52	9.89
39	84.47	2.54	12.99
40	50.00	24.50	25.50
41	54.75	4.57	40.68
42	12.00	47.00	41.00
43	14.07	44.22	41.71
44	71.04	22.51	6.44
45	20.00	32.00	48.00
46	100.00	0.00	0.00

5.2.4 Experimental procedure

The experiment was conducted in triplicate (n=3) and lasted for 13 days. At day 0, media (74 mL) were inoculated with a green microalga *Scenedesmus obliquus* (CPCC 5) culture in exponential growth phase (6 mL) for an initial volume of 80 mL at an initial cell concentration of 1×10^6 cell mL⁻¹ in 250 mL culture flasks. Initial composition of the complex culture medium was 60% (v/v) Bold's basal medium (BBM) + 40% (v/v) cheese whey permeate (WP). BBM (Stein, 1973) was heat sterilized (121°C, 15 min), while WP was sterilized by filtration (0.2 µm). Cultures were kept on an orbital shaker at 120 rpm (C1 platform shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) at 22.5°C under constant illumination and light intensity of 100 µE m⁻² s⁻¹, as measured at the surface of the flasks using a Q201 quantum radiometer (Macam Photometrics Ltd., Livingston, Scotland). All manipulations were realized in a laminar flow hood and axenic culture conditions were confirmed by flow cytometry (Epic Altra, Beckman Coulter Inc., Fullerton, BC, CA) at the beginning and end of each experiment.

Medium sugars and total dissolved solids content (DSC) were analyzed daily by sampling 5 mL of culture. Triplicate FT-IR/ATR spectra were acquired directly for each sample, then centrifuged at 1500 g for 5 min and another triplicate FT-IR/ATR spectra was acquired. Fixed volume (4 mL) of this supernatant was taken and weighed. The culture

medium sample was then freeze-dried, and proportion of the total DSC determined (mg g^{-1} of culture medium). The weight average of all 4 mL samples was $4.07 \pm 0.04 \text{ g}$ for a culture medium density of $1017 \pm 11 \text{ g L}^{-1}$. Total DSC (in mg g^{-1}) was converted in g L^{-1} by multiplication of culture medium density.

5.2.6 Sugar analysis using the GC-MS method

Total DSC were silylated prior to gas chromatography. Lyophilized material (3 mg) and arabinose (1 mg) were dissolved in anhydrous pyridine obtained by distillation over calcium hydride (0.3 mL), and were treated with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (0.3 mL) containing 1% (v/v) of chlorotrimethylsilane under nitrogen atmosphere. The solution was heated to 70°C during 4 h. The solution was then allowed to reach room temperature and was evaporated to dryness with a nitrogen flow. The resulting white solid was dissolved in hexane (4 mL) and the solution was filtered before analysis by GC-MS (Agilent Technologies, GC model 6850 series II and MS model 5975B) equipped with a HP-5MS capillary column (30 m x $250 \mu\text{m}$ x $0.25 \mu\text{m}$ film thickness) with 5 % phenyl methyl siloxane. Initial oven temperature was 80°C for 5 min and was increased at a rate of $4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ until it reached 290°C followed by a post run at 300°C . Injector temperature was 250°C and a constant helium flow of 1.2 mL min^{-1} was used. A volume of $1 \mu\text{L}$ of sample was injected. Silylated arabinose was utilized as internal standard. Commercial sugars were used for calibration after silylation as described above.

5.2.7 Statistical analysis

A repeated measures ANOVA with time between days 0 to 7 as repeated measure was performed to determine differences between sugar concentrations obtained with or without microalgae cells (before and after the centrifugation). The normality was verified by a Shapiro-Wilk test and the variances homoscedasticity through direct observations of residuals using the expected normal probability plot. Analyses were carried out using the software R (version 2.15.1).

5.3 Results and discussion

5.3.1 Sugar concentration monitoring using the univariate model

As lactose is the major sugar (> 95%) present in our complex culture medium, the linear regression made from the integration of the region between 1186 and 933 cm^{-1} obtained from the IR spectra of pure lactose aqueous solution (Figure 5.1) was used as univariate model for the daily monitoring of the sugar concentration during the first 7 days of microalgae cultivation. Relative intensities and wavenumbers of the C-O, C-C and C-OH stretching bands (1186-933 cm^{-1}) were unchanged during this period of time (Figure 5.2-A.).

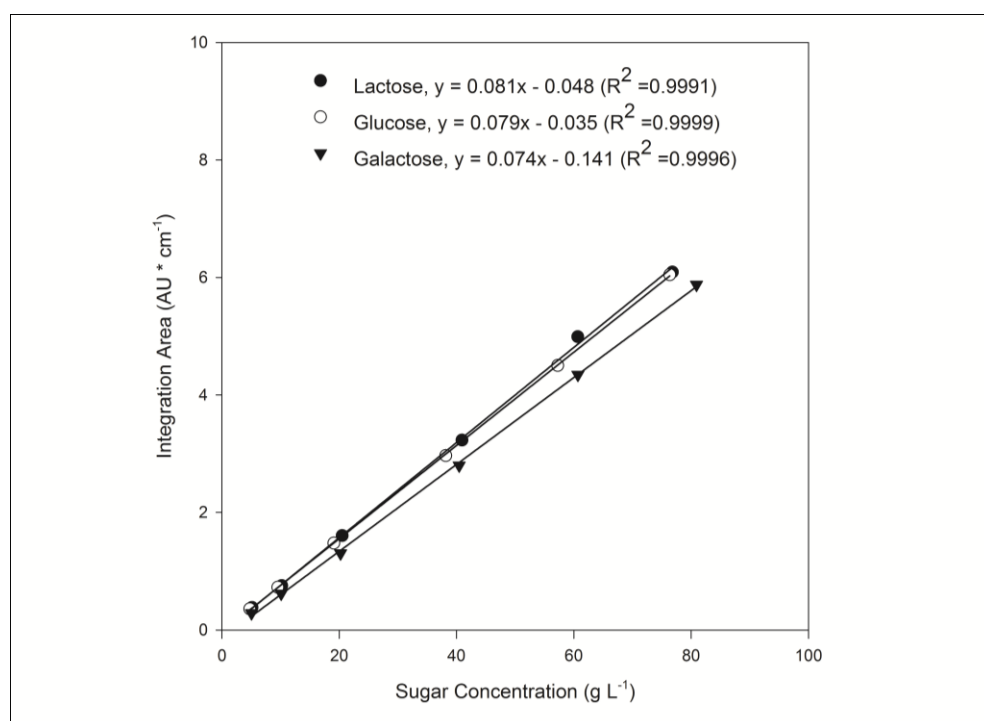


Figure 5.1 Calibration curves of aqueous solutions made from pure lactose, glucose and galactose in the concentration range 5 – 70 g L^{-1} .

Spectra of the culture media were acquired before and after a centrifugation step (5 min at 1500 g) in order to observe whether the presence of living cells in the medium influences the readings of the ATR probe (Figure 5.2-B.). ANOVA results indicated no significant interaction between presence of microalgae cells and time of culture ($F_{(1)} = 1.3$, $p = 0.25$). The presence of cells by itself was not significant ($F_{(1)} = 0.7$, $p = 0.42$), but the time of culture was strongly significant ($F_{(1)} = 137.7$, $p < 0.0001$). Thus, living cells in the medium do not significantly influence the readings of the ATR probe, but the time of culture was related to a significant decrease of the sugar concentration in the medium. The reduction in sugar concentration between days 1 to 7 was correlated with the reduction in total DSC ($R^2 = 0.74$). This result validates the predictive capacity of the univariate model.

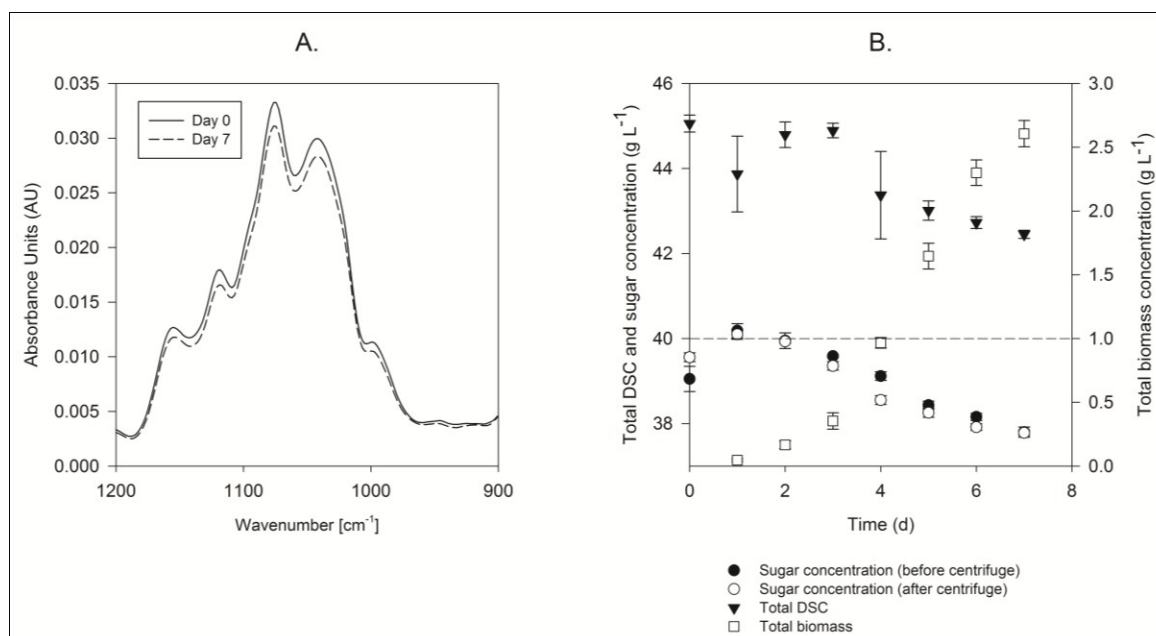


Figure 5.2 Mid-infrared absorbance spectra (A) and sugar concentration in the culture media over 7 days (univariate model estimation from spectra acquired in presence (before centrifuge) or in absence (after centrifuge) of the cells) as well as total dissolved solids content and biomass density as measured gravimetrically (B).

5.3.2 Proportional monitoring of sugars using the multivariate model

Culture medium samples from days 0 to 13 of the experiment were freeze dried and silylated before their analysis by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS) in order to determine sugar contents. This technique allows the characterization of complex saccharides mixtures with high sensitivity (Cerdán-Calero et al., 2012). Upon analysis of the chromatograms, lactose, glucose and galactose peaks were observed (Figure 5.3-A). Quantification was performed using calibration curves made from pure sugars solutions. The proportion of each individual sugar was then calculated and the sum of lactose + glucose + galactose was considered as the “total sugar” fraction. Interestingly the proportion of the two monosaccharides increased over time with concomitant decrease in lactose concentration (Figure 5.3-B).

The PLS algorithm integrates the information contained in an IR spectrum by a simultaneous and mutually dependent factorization of both the spectral and quantitative information contained in the matrices of the calibration data set (Haaland & Thomas, 1988). Table 5.2 presents important calibration and prediction parameters of the PLS regressions developed from the IR spectra of aqueous mixtures of pure lactose, glucose and galactose (multivariate model). Vector Normalization (VN) was selected as data preprocessing method in order to eliminate the influence of the amplitude of the spectra. Indeed, a spectrum contains two parts of information: the amplitude of the band, reflecting the absolute concentration of the analytes, as well as the structure, reflecting the nature of the analytes present in the solution. VN preprocessing consists first in centering the spectra. Then, the sum of all square of all Y – values is calculated, and the respective spectrum is divided by the square root of this sum. The so-called vector norm of the resulting spectrum is thus always 1 (Conzen, 2006). To our knowledge, it is the first time that this type of data preprocessing is used to proportionally quantify the sugars present in a solution.

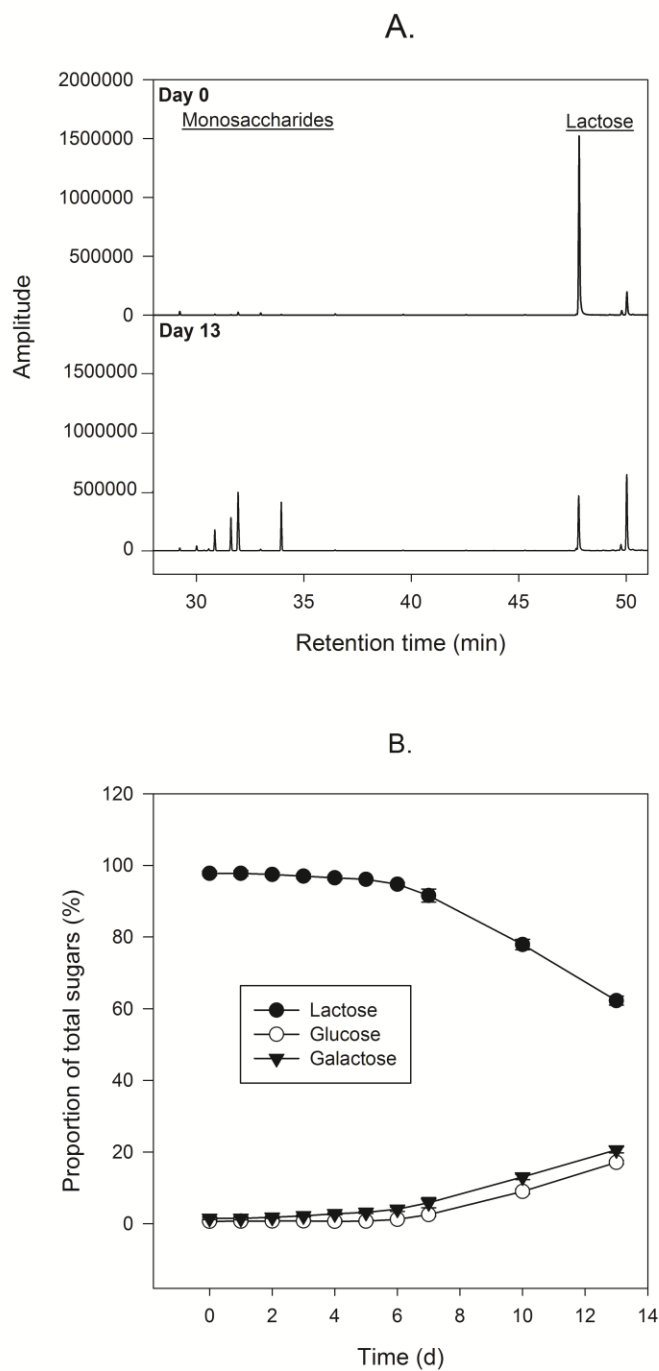


Figure 5.3 Gas chromatogram (A) and proportions of each sugar present in the complex culture medium (B) from days 0 to 13 as measured by the reference procedure (GC-MS).

Table 5.2 Summary of the main calibration and prediction parameters of the PLS regression developed for the determination of lactose, glucose and galactose. Proportions are expressed in % of total in a solution containing 100 g L⁻¹ sugar.

Analyte	Data preprocessing	Rank ^a	RMSECV ^b (%)	Bias (%)	RPD ^c	R ²
Lactose	VN ^d	7	0.468	0.010	48.6	99.96
Glucose	VN ^d	8	0.476	- 0.004	32.2	99.90
Galactose	VN ^d	7	0.414	- 0.005	36.4	99.92

^a Rank indicates the number of factors included in the model.

^b RMSECV stands for root mean square error of cross validation.

^c RPD stands for residual prediction deviation.

^d VN stands for vector normalization.

Selecting the appropriate number of factors (rank) to include in the PLS model is important as too few factors leads to insufficient spectra structure recognition (“underfitting”) and too many leads to deterioration of the analysis by the inclusion of the spectral noise (“overfitting”). The values of the root-mean-square-errors of cross validation (RMSECV) as well as the coefficient of determination (R²) were used in order to select the appropriate number of factors to include in the model. The selection of an appropriate frequency range is also of crucial importance for the quality of the PLS model. The same region of the spectrum used for total sugar quantification (1186-933 cm⁻¹) was selected. Further optimization of the model by inclusion of different frequency ranges was tested using the OPUS software without improvement of the RMSECV or diminution of the rank.

Cross validation of the model presented strong statistical values with RMSECV ranging between 0.406 and 0.479% and R² ranging between 99.96 and 99.90 (Table 5.2). The residual prediction deviation (RPD) is a qualitative measure for the assessment of the validation results. The cross validation results for this parameter were high (between 31.2 to 49.2) as a method with a RPD > 8 is already considered an excellent method to perform analytical tasks (Conzen, 2006).

Table 5.3 presents a comparison of the proportion of lactose, glucose and galactose predicted by the multivariate model on microalgae culture media spectra at days 0, 7 and 13 with results obtained from the GC-MS analysis. The percentage of relative deviation (% RD) values for lactose were always less than 9.6. For sugars representing less than 20% of the total sugar concentration, the % RD was between 0.2 and 186.7. The test samples were all considered as “outlier” based on the Mahalanobis distance indicator (limit = 0.15). This indicates that the culture medium spectra may contain structures which do not “fit” the model because it was built from pure sugar samples. The presence of other analytes absorbing in the same region of the spectrum (in the original composition of the BBM or the cheese whey permeate) could explain this phenomenon. However, the relatively low difference observed between the values predicted by the multivariate model and those obtained with the GC-MS reference procedure indicates a prediction capacity of over 90% for sugars representing $\geq 20\%$ of the total.

It is interesting to note that the total sugar concentrations from the test samples were lower than the one used to calibrate the model (~ 40 vs. 100 g L^{-1}), and that the sum of the values obtained for Lac, Glu and Gal from the model always remains close to 100 (Table 5.3). This confirms that the VN preprocessing method retains only the structural components of the spectral information and that the model predicts the relative proportion of each sugar instead of its absolute concentration in the solution. This type of model could be particularly useful for example to study rates of hydrolysis or diauxie in biological cultures.

Table 5.3 Comparative results of the proportion of each sugar present in the culture medium as estimated by the multivariate model and the gas chromatographic method (GC-MS) at days 0, 7 and 13 of the experiment.

		Multivariate model (%)	GC-MS (%)	% RD^a	Mahalanobis distance
Day 0	Lac	96.8	97.8	-1.0	7.7
	Glu	0.5	0.7	-28.6	8.8
	Gal	4.3	1.5	186.7	9.1
	Sum	101.6	100.0	1.2	
Day 7	Lac	89.9	91.6	-1.9	6.4
	Glu	2.9	2.5	16.0	6.4
	Gal	8.5	5.9	44.1	8.2
	Sum	101.3	100.0	-0.1	
Day 13	Lac	68.3	62.3	9.6	7.4
	Glu	12.1	17.1	-29.2	7.5
	Gal	20.9	20.6	1.5	7.6
	Sum	101.3	100.0	0.2	

^a % RD, percentage relative difference ((Multivariate model- Reference method)*100/Reference method)

The saccharide content of a culture medium is subject to high fluctuation due to consumption, hydrolysis or production by the microorganisms. Building quantitative PLS models from the spectra of the culture medium can be difficult due to the production of collinear data sets. On the other hand, the use of pure sugar solutions for the construction of predictive models based on the FT-IR/ATR technology is quick and simple as no complex validation methods, such as chromatographic methods, are necessary. The work presented here demonstrates that this type of models can be useful to estimate quantitative and qualitative variations occurring in complex microbiological culture media during cultivation.

The proposed method, based on the PLS algorithm, compares favourably with what is available in the literature for the determination of sugars in biological culture media using FT-IR/ATR in regards to performance and accuracy. Hashimoto and Kameoka (2000) used the peak wavelength of each sugar present in a given plant-cell culture media formulation to build predictive models that are assuming spectral additivity. The use of PLS regressions improves the accuracy of the model since it includes the variations in

absorbance that could be due to interactions between analytes. The intrinsic property of PLS regressions to include the information contained in the whole spectrum, or selected bands, becomes even more advantageous when a large number of analytes are to be included into the model (Hernández-Martínez et al., 2013).

Lastly, it is worth mentioning the importance of model selection as many important parameters such as: choice of representative calibration and validation data sets, selection of spectral bands, data preprocessing methods and choice of the number of factors to be included in the model can greatly influence the prediction capacities of the model. Moreover, specific measures should be considered when it comes to the selection of models built from surrogate mixtures (Krasznai et al., 2012).

5.4 Conclusion

This paper shows that FT-IR/ATR technology in combination with an external light guiding fiber probe is a fast and efficient way to monitor the sugars in a biological cultures and could be used on-line or at-line into automated industrial-scale bioprocesses. Presence of cells did not significantly affect readings by the ATR probe and calibration models made from pure sugar solutions allowed monitoring the sugars in a complex culture medium. The proportion of each sugar present in the complex medium was determined using a PLS regression model built from a vector normalized calibration data set.

CHAPITRE 6 Optimisation de l'accumulation de lipides neutres chez trois espèces de microalgues par la méthode des surfaces de réponse

Avant-propos

Auteurs et affiliation :

Jean-Michel Girard : étudiant au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Réjean Tremblay : professeur, Institut des Sciences de la Mer, Rimouski (Qc).

Nathalie Fauchoux : professeure, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Michèle Heitz : professeure, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Jean-Sébastien Deschênes : professeur, Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski.

Date de soumission :

Octobre 2014

Revue :

Bioressource Technology

Titre français :

Optimisation de l'accumulation de lipides neutres chez trois espèces de microalgues par la méthode des surfaces de réponses.

Contribution au document :

Cet article contribue à la thèse en présentant les conditions optimales de pH, de densité cellulaire et de temps d'incubation permettant une accumulation rapide et efficace de lipides neutres chez trois espèces de microalgues mixotrophe (*Scenedesmus obliquus*, *Ankistrodesmus convolutus* et *Chlorella protothecoïdes*). Une utilisation originale de la méthode des surfaces de réponse a permis de construire 6 modèles prédictifs et de comparer les résultats obtenus pour chaque espèce en photoautotrophie et en hétérotrophie en plus de permettre plusieurs observations importantes sur les différences inter-espèce existantes.

Résumé français :

Dans le développement d'un procédé de culture de microalgues en deux étapes pour la production de biodiesel, des procédures normalisées doivent être mises au point pour l'induction rapide et efficace de l'accumulation de lipides neutres (NL) à l'échelle cellulaire. Dans le présent travail, des conditions de culture mixotrophes ont été fournies à trois souches de microalgues différentes afin d'obtenir une productivité de biomasse optimale au cours de la première étape du procédé. Cette biomasse a ensuite été utilisée dans la seconde étape afin d'optimiser les conditions de pH, la densité de la biomasse et le temps d'incubation conduisant à l'accumulation de NL dans des cultures carencées en azote. Pour ce faire, la méthode des surfaces de réponse a été utilisée et deux modèles ont été construits pour chaque souche (photoautotrophie et hétérotrophie). La comparaison intra- et inter-espèce des résultats a permis de tirer des conclusions importantes sur les effets du pH, du régime de lumière et des modes nutritifs sur l'induction de l'accumulation de NL chez les microalgues. *Chlorella protothecoïdes* est la seule espèce qui a accumulé une quantité significative de NL en l'absence de lumière, dans des cultures présentant une densité de biomasse $> 5 \text{ g L}^{-1}$ et à pH neutre. En revanche, la présence d'une source lumineuse et un pH élevé ($\geq 9,5$) étaient nécessaires pour l'accumulation de NL chez *Scenedesmus obliquus* et *Ankistrodesmus convolutus*.

**Response-surface methodology to optimize neutral lipid accumulation
in three mixotrophic microalgae species**

*Jean-Michel Girard^{1,2,3}, Réjean Tremblay², Nathalie Fauchoux¹, Michèle Heitz¹, Jean-
Sébastien Deschênes³*

¹ Département de Génie Chimique et Génie Biotechnologique, Université de Sherbrooke
2500, boul. de l'Université, Sherbrooke (Québec) Canada, J1K 2R1;

² Institut des Sciences de la Mer,
310, allée des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1 ;

³ Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski,
300, allée des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1;

Abstract

In the development of a two stages microalgae cultivation process for biodiesel production, standardized procedures must be developed for the rapid and efficient induction of neutral lipid (NL) accumulation at the cellular level. In the present work, mixotrophic culture conditions were provided to three different strains in order to obtain high biomass productivity during the first stage of the process. This biomass was then used in the second stage to build Response-Surface Methodology (RSM) models in order to optimize the conditions of pH, biomass density and time of incubation leading to NL accumulation in nitrogen starved cultures. For each of the three strains, two models were built, one in photoautotrophy and one in heterotrophy. Intra- and inter-strains comparison of the results allowed drawing important conclusions about the effects of pH, light-regime and nutrition modes on the induction of NL accumulation in microalgae. *Chlorella protothecoides* could accumulate NL in the absence of light at ultrahigh cell density cultures and neutral pH. In contrast, different light-regime threshold, and high pH (≥ 9.5) were necessary for NL accumulation to occur in *Scenedesmus obliquus* and *Ankistrodesmus convolutus*.

Keywords: Neutral lipid accumulation, Biodiesel, Microalgae, Nile red, Response-Surface methodology

6.1 Introduction

Microalgal neutral lipids (NLs) can serve as feedstock for the production of biodiesel (Hu et al., 2008). Research is currently oriented toward the development of industrial scale cultivation processes in order to provide a renewable energy supply for the future (Wijffels & Barbosa, 2010). However, several technical challenges remain before making the microalgal biodiesel industry profitable (Lam & Lee, 2012). At the cellular scale, increasing the NL content of cells could help to reach this objective by increasing the proportion of the biomass that can be converted into biodiesel. A number of eukaryotic microalgae species, mainly from the phyla *Chlorophyta* and *Heterokontophyta*, are known to accumulate NL when submitted to particular environmental and nutritional rearing conditions such as nitrogen or silicate starvation (Sheehan et al., 1998).

Using such stresses to rapidly and efficiently induce NL accumulation in microalgae is an important subject of research. This is largely due to the fact that generally the metabolic pathways of cell division must slow down or completely stop to give way to the NL accumulation metabolism (Breuer et al., 2012). While some studies are actually conducted for the development of culture systems stimulating high growth rates and high lipid content simultaneously (Khozin-Goldberg & Cohen, 2011; Klok et al., 2013; Zhou et al., 2013), the two-stage cultivation process (2SCP) offers a simple and promising alternative. In this well-documented concept, the lipid productivity of a microalgal culture can be maximized by adding a “lipid accumulation” stage following the “biomass production” stage (Huntley & Redalje, 2006). During the first stage of a 2SCP, culture conditions must be optimized to obtain the highest biomass productivity possible, while during the second stage, culture conditions must be optimized to efficiently induce NL accumulation, and reach the highest lipid cellular content in the shortest time possible.

Mixotrophy and heterotrophy are nutrition modes generally allowing for higher biomass productivity and density in certain microalgae species compared to strict photoautotrophic cultures (Bumbak et al., 2011), and the induction of the NL accumulation metabolism under these conditions is also actively investigated (Cheirsilp

& Torpee, 2012; Heredia-Arroyo et al., 2010; Wan et al., 2011). Higher density cultures also means less pumping energy, less storage space and easier harvesting of the biomass. Therefore, the introduction of one or more mixo/heterotrophic stage(s) in the bioprocess could help bringing the industry to profitability (Bumbak et al., 2011). These economies must however compensate for the cost of the dissolved organic (DOC) carbon source used during the mixo/heterotrophic stage. Hence the importance to consider the use of affordable DOC sources, such as wastewaters or industrial residual matters (Bhatnagar et al., 2011; Hodaifa et al., 2013).

Several studies have demonstrated that nitrogen starvation can induce NL accumulation in various microalgae species such as *Scenedesmus* spp., *Chlorella* spp. and *Ankistrodesmus* spp. (Chu et al., 1995; Heredia-Arroyo et al., 2010; Lin & Lin, 2011). More recently, alkaliphilic conditions (pH >9) was also related to NL accumulation in some microalgae strains (Gardner et al., 2011). To optimize the conditions leading to NL accumulation in a 2SCP fashion and assess the effect of nutrition modes, pH, biomass density and time of incubation, and interactions between these factors on this phenomenon, the Response-Surface Methodology (RSM) coupled with Central Composite Design (CCD) was employed. Predictive models were built for three promising microalgae species for the biodiesel industry (*Scenedesmus obliquus*, *Ankistrodesmus convolutus* and *Chlorella protothecoides*) under photoautotrophic and heterotrophic culture conditions.

6.2 Material and methods

6.2.1 Microalgae strains and media

Ankistrodesmus convolutus (CPCC309) and *Scenedesmus obliquus* (CPCC 5) obtained from the Canadian Phycological Culture Center (Waterloo, ON) and *Chlorella protothecoides* (UTEX 255) from the University of Texas (Austin, TX) were maintained at 22.5°C in Bold's basal medium (BBM) (Stein, 1973), at an initial pH of 6.8 with agitation at 120 rpm. For *C. protothecoides*, 1 g L⁻¹ soy protein peptone (Sigma-Aldrich) was also present in the medium. All media were heat sterilized (121°C for 15

min). Continuous illumination ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) as measured at the surface of the flasks using a Q201 quantum radiometer (Macam Photometrics Ltd., Livingston, Scotland) was provided by fluorescent light lamps.

6.2.2 Experimental procedure and Nile Red analysis

For each specie, a 7 L photobioreactor (PBR) (Applikon Biotech, Schiedan, Netherlands) containing 3.7 L of mixotrophic medium (Table 6.1) was inoculated with a 0.3 L culture for an initial working volume of 4 L. Inoculum consisted in 10 mL of culture in stationary growth phase transferred into 290 mL of fresh BBM and incubated for 3 days in continuous illumination and 0.3 L min^{-1} air bubbling. Cultures were kept in the PBR mixotrophic conditions (pH 7.0, aeration rate of 0.7 L min^{-1} , $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 7 days before the 4 L culture was harvested in sterile conditions. The culture was then centrifuged (15 min at 3500 g), the pellet washed once with heat sterilized distilled water, and then resuspended at the desired biomass density (Table 6.2). Aliquots of 15 mL were transferred in sterile tubes. After another centrifugation (5 min at 3500 g), pellets were resuspended in 15 mL of their respective media: BBM without nitrate ($\text{BBM}_{\text{-Ni}}$) for the photoautotrophic group, $\text{BBM}_{\text{-Ni}} + 10 \text{ g L}^{-1}$ glucose for the heterotrophic group before being transferred in 50 mL culture flasks. The pH of the media had been fixed to 7, 8.5 or 10 prior to the sterilisation step by using respectively PIPES, bicine and bicarbonate buffers at a concentration of 25 mM and adjusted with a 1 M solution of sodium hydroxide.

At the end of the determined incubation time, a 1 mL culture sample was directly used for intracellular NL content determination (see below) and a 10 mL sample was harvested by centrifugation (3500g for 5 min). A measure of the final pH was taken directly on this supernatant using a bench top pH meter. The pellets were then washed once with distilled water and kept at -80°C until freeze-drying and final yield determination ($\text{g dry biomass L}^{-1}$).

Intracellular NL content was determined by flow cytometry following the method described by de la Jara et al. (2003) and Doan and Obbard (2011). Briefly, fresh cultures

were diluted to 1×10^6 cells mL^{-1} in Tris-buffered Saline (TBS). Cells membranes were permeabilized by adding dimethyl sulfoxide (DMSO) at 15% final concentration. Cells were then stained with NR (Invitrogen) at $0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ final concentration, in the dark at room temperature for one hour. Single-cell fluorescence was measured using an Epics Altra flow cytometer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, BC, CA) fitted with a 488 nm laser operated at 18 mW. The NR fluorescence of at least 10 000 cells was measured at 575 ± 20 nm. The mean fluorescence of the cells was normalized by the fluorescence of $2 \mu\text{M}$ microspheres (Fluoresbrite YG, Polysciences) that were added to each sample.

6.2.3 Experimental design and statistical analysis

RSM coupled with CCD was used to optimize NL accumulation in three microalgae species for the following parameter: pH, time of incubation and biomass density under photoautotrophic and heterotrophic conditions (Table 6.2). For three-factors, three-levels CCD and “face centered” alpha, statistical theory suggests 20 runs, which includes 14 extra-center points (factorial and axial), and 6 replicates at the center point (Table 6.3). Dry biomass densities were different from one strain to the other as related to the different productivities obtained during the mixotrophic preparation of the biomass (see Table 6.1 and section 6.3.1).

Design Expert software (trial version 8.0.6, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) was used to design the experiment and realize statistical analysis of the data. The obtained experimental data were fitted to quadratic polynomial equations and factor levels were coded as described elsewhere (Xie et al., 2012).

6.3 Results and discussion

6.3.1 First stage: production of the biomass

The first step of the experimental procedure was the production of a biomass to use as raw material for the different conditions to be tested. Table 6.1 presents the results obtained with each species during this first stage. Mixotrophic conditions were used in order to reach higher growth rates and productivity of the cultures (Chu et al., 1995;

Heredia-Arroyo et al., 2010; Mandal & Mallick, 2009) and to limit the time of adaptation when the cells were to be transferred into strict photoautotrophic or heterotrophic conditions of the experiment (Martínez et al., 1997). Indeed, generally, mixotrophic conditions allow both the photosynthetic and respiration metabolisms to operate simultaneously or alternately inside cells (Lee, 2004a).

For *S. obliquus*, a particular mixotrophic medium was used (Table 6.1) on the basis of our previous study showing that this strain is able to use the lactose contained in cheese whey permeate (WP) for growth (Girard et al., 2013). The use of such residual matter of the dairy industry could help to limit the costs associated with the DOC source supply and could render the whole process possible on a larger scale. The *S. obliquus* culture only yielded 28% of the final wet biomass obtained with the *C. protothecoides* culture, and 62% of the *A. convolutus* culture. This could be due to a suboptimal growth due to the nature of the carbon source used (lactose vs glucose).

Table 6.1 Mixotrophic media and biomass production in PBR.

Specie	Medium	Incubation time (days)	Final wet biomass (g L ⁻¹)
<i>S. obliquus</i>	80% (v/v) H ₂ O _d + 20% (v/v) cheese whey permeate + 5 mM NaNO ₃ + Trace metal mix	7	6.9 ± 0.3
<i>A. convolutus</i>	Glucose (20 g L ⁻¹) + peptone (4 g L ⁻¹) in H ₂ O _d	7	11.1 ± 0.3
<i>C. protothecoides</i>	Glucose (20 g L ⁻¹) + peptone (4 g L ⁻¹) in H ₂ O _d	7	24.4 ± 0.6

6.3.2 Second stage: induction of NL accumulation

The biomass produced under mixotrophic conditions was used to inoculate the samples of the RSM experiment at the initial conditions dictated by the three factors, three levels CCD (Tables 6.2 and 6.3). These samples were incubated for 3, 5 or 7 days in photoautotrophic or in heterotrophic culture conditions. Cells were then permeabilized and intracellular lipids colored using NR staining. Variations in NL cellular contents

were estimated by evaluation of the normalized mean cell fluorescence at 575 ± 20 nm by a flow cytometer and the results were used to build the RSM models.

Table 6.2 Coded levels for independent factors of the Central Composite Design (CCD).
S. obliquus (SO), *A. convolutus* (AC), *C. protothecoides* (CP).

Factors	Symbol	-1	0	1
Time (days)	x_1	3	5	7
Dry biomass density (g L ⁻¹)	x_2 (SO)	0.7	3.1	7.2
	y_2 (AC)	2.4	9.2	21.4
	z_2 (CP)	8.0	27.1	50.0
pH	x_3	7.0	8.5	10.0

Table 6.3 Central Composite Design (CCD) of experiments

Run	Time	Biomass density	pH
	x_1	x_2, y_2, z_2	x_3
1	0	0	-1
2	0	0	0
3	-1	1	1
4	1	-1	1
5	0	1	0
6	0	0	0
7	1	1	1
8	-1	-1	-1
9	0	0	1
10	-1	0	0
11	0	0	0
12	1	-1	-1
13	0	-1	0
14	0	0	0
15	1	0	0
16	-1	1	-1
17	1	1	-1
18	0	0	0
19	-1	-1	1
20	0	0	0

6.3.3 RSM models development and analysis of variance (ANOVA)

For each of the three species under study, two different models (photoautotrophic and heterotrophic) were built on the Log_{10} transformed data for a total of six RSM models. Table 6.4 presents the equations and main ANOVA results for these models. When building the equations of the models, a stepwise selection of terms was performed in order to keep only the terms significantly affecting the output of the response variable ($p < 0.10$). In all three photoautotrophic models, a significant interaction was found between biomass density and pH as the “ x_2x_3 ”, “ y_2x_3 ” and “ z_2x_3 ” terms were included in the SO-Auto, AC-Auto and CP-Auto models, respectively. In all cases, except the *A. convolutus* heterotrophic model (AC-Hetero), the significant terms were used to build second-order polynomial equations. For the AC-Hetero data set, only the “ x_1 ” factor (time of incubation) was shown to have a significant effect on the mean cell fluorescence, therefore a simple linear regression was produced and this model could explain 67% of the variability ($R^2 = 0.67$).

ANOVA results of all the quadratic polynomial models showed strong statistical significance ($p < 0.001$) and R^2 between 0.80 and 0.96. The “lack of fit” was highly significant for the *S. obliquus* photoautotrophic model (SO-Auto). This indicator provides information on how much the model fits the data and it is recommended that it is not significant (Anderson & Whitcomb, 2005). However, this was not considered problematic for our study as RSM was used to compare species and culture conditions rather than to build highly accurate predictive models. It is also noted that the R^2_{pred} is also an indicator of the predictive capacity of the model (Anderson & Whitcomb, 2005) and it showed acceptable values (close enough to the R^2_{adj} values) for all models (Table 6.4). Thus experimental data confirmed predictive results obtained with each model (Annexe B – Tables S1 and S2). Table 6.5 presents the values that should take the factors in order to maximize the NL productivity of the microalgae culture as dictated by the different models for each scenario. In any case, the time of incubation should be maximized.

Table 6.4 Equations and summary of the main “analysis of variance (ANOVA)” results of the six RSM models. Raw data was Log₁₀ transformed. (SO = *S. obliquus*; AC = *A. convolutus*; CP = *C. protothecoides*; Auto = photoautotrophy; Hetero = heterotrophy; Df = degree of freedom; SS = sum of squares).

	Equation (coded factors)	Model			Residual	R ²	R ² _{Adj}	R ² _{Pred}
		Df	F value	p value	Lack of fit (p value)			
SO-Auto	P = -1.67 + 0.13x ₁ - 0.35x ₂ + 0.25x ₃ - 0.075x ₂ x ₃ + 0.48x ₂ x ₂ + 0.12x ₃ x ₃	6	41.64	<0.001	<0.001	0.95	0.93	0.85
SO-Hetero	P = -1.05 + 0.11x ₁ - 0.26x ₂ - 0.66x ₃ + 0.062x ₁ x ₂ - 0.11x ₂ x ₂	5	74.03	<0.001	0.369	0.96	0.95	0.92
AC-Auto	P = -0.71 + 0.1x ₁ - 0.15y ₂ + 0.14x ₃ - 0.092y ₂ x ₃ + 0.21y ₂ y ₂ - 0.17x ₃ x ₃	6	26.49	<0.001	0.056	0.92	0.89	0.73
AC-Hetero	P = -0.89 + 0.14x ₁	1	36.88	<0.001	0.0383	0.67	0.65	0.58
CP-Auto	P = 0.34 + 0.05x ₁ + 0.066z ₂ - 0.092x ₃ + 0.094z ₂ x ₃ - 0.1x ₁ x ₁ - 0.12z ₂ z ₂ + 0.15x ₃ x ₃	7	8.72	<0.001	0.7365	0.84	0.74	0.56
CP-Hetero	P = 0.48 + 0.11x ₁ - 0.027z ₂ - 0.08x ₃ + 0.091z ₂ x ₃ - 0.13z ₂ z ₂	5	11.55	<0.001	0.2536	0.80	0.74	0.61

Table 6.5 Parameters dictated by each of the RSM models in order to maximize NL accumulation.

	Time (days)	Biomass density (g L⁻¹)	pH
SO-Auto	7	0.7	10
SO-Hetero	7	0.7	9.8
AC-Auto	7	2.4	9.5
AC-Hetero	7	2.4	9.5
CP-Auto	7	26.6	7
CP-Hetero	7	23.1	7

Figure 6.1 presents 3D surface graphs of the interactive effect of biomass density and pH on NL cellular content for each of the six models. Although not significant in *S. obliquus* and *A. convolutus* heterotrophic models (Table 6.4, SO-Hetero and AC-Hetero), this interaction is presented to allow an intraspecific (photoautotrophic vs heterotrophic) and interspecific (*S. obliquus* vs *A. convolutus* vs *C. protothecoides*) comparison of the results (discussed below).

6.3.4 Evolution of pH over the course of the RSM experiments

Biomass density and pH were analyzed at the time of harvest for every sample, in order to monitor the variations which could have occurred during incubation (Annexe B – Figures S1 and S2). The most important shift in pH was observed for samples with an initial pH of 10 although the culture medium was buffered by 25 mM bicarbonate. Under photoautotrophic conditions, the pH of *S. obliquus* cultures was increased by 0.8 ± 0.4 units, demonstrating a strong natural tendency to basification of the culture medium under these conditions. This is due at least in part to the assimilation of CO₂, nitrate and phosphate by the microalgae culture (Becker, 1994). The same phenomenon was observed for *A. convolutus*, but not for *C. protothecoides*. Interestingly, these high pH samples were also the ones showing the highest NR fluorescence, thus supporting the observation made by Gardner et al. (2011) that high pH is associated with NL accumulation in some microalgae species.

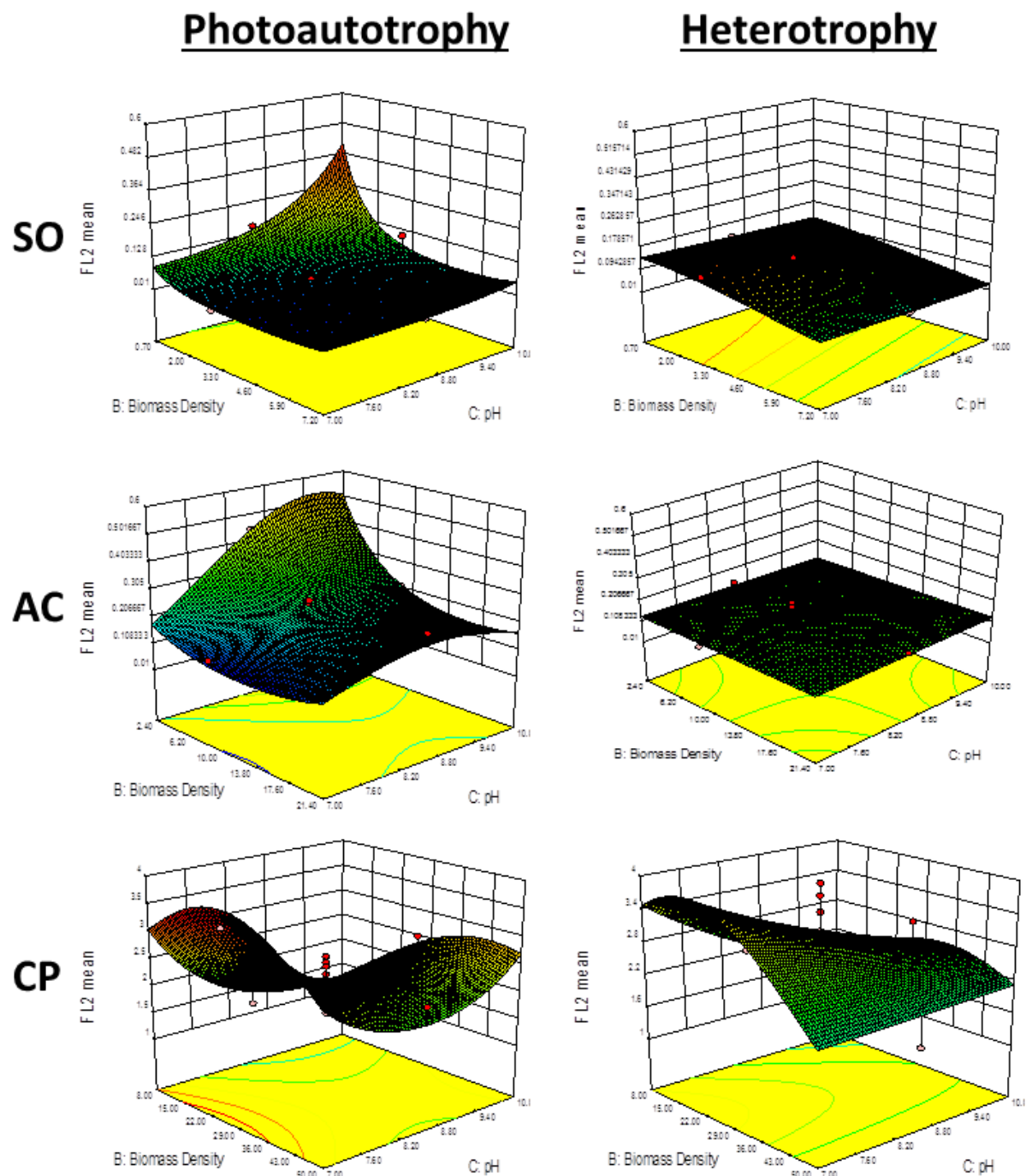


Figure 6.1 3D response-surface graphs of the six RSM experiments showing the interactive effect of pH and biomass density on mean cell fluorescence (FL2 mean) for *Scenedesmus obliquus* (SO), *Ankistrodesmus convolutus* (AC) and *Chlorella protothecoides* (CP).

On the other hand, for the same initial pH value of 10 under heterotrophic conditions, all three strains induced an average decrease of -1.4 ± 0.6 units of pH. Acidification of the culture medium could be due to the release of H^+ during active transport of glucose across the plasma membrane by the HUP1 transporter (Perez-Garcia et al., 2011b). To circumvent this effect, two other biological buffers (25 mM CAPS and 25 mM bicarbonate + 25 mM sodium carbonate) were tested without success (Annexe B – Figure S2). This result suggests that the high pH conditions associated with NL accumulation in some species under photoautotrophic conditions might be difficult to maintain under heterotrophic culture conditions.

6.3.5 Intraspecific comparison of the results

In *S. obliquus* cultures, a significant increase in fluorescence was observed only in the photoautotrophic model, in conditions of high pH (10) and low cell density (0.7 g L^{-1}). Indeed, the maximum value of fluorescence recorded during the photoautotrophic experiment was 3 times higher than in heterotrophy (0.5 vs 0.2). Similar results were obtained with *A. convolutus* cultures where fluorescence was 4 times higher in photoautotrophy (0.8 vs 0.2). These results therefore demonstrate that, under the experimental conditions tested here, illumination was essential to efficiently induce NL accumulation in these species.

For *C. protothecoides*, all the fluorescence values were ranging between 1.0 and 5.0. The terms of the equations retained during the stepwise selection were similar for both the photoautotrophic and heterotrophic models, except for the A^2 and C^2 terms only present in the photoautotrophic model (Table 6.4). However, presence of light during the NL accumulation phase clearly affected some cellular metabolism and chlorophyll content as demonstrated by light-green color taken by the samples of the photoautotrophic experiment (Figure 6.2). Also, the CP-Auto 3D surface graph presented a “saddle” shape, while the CP-Hetero graph presented a “rising ridge” shape (Figure 6.1). The saddle, or “mini-max” presents major problem for finding a maximum point because one can get stuck in the saddle or push up to the lesser peak at left or right, and thus the true optimum may get lost in the shuffle (Anderson & Whitcomb, 2005).



Figure 6.2 Photoautotrophic (A20) and heterotrophic (H20) cultures of *C. protothecoides* at the end of the RSM experiments.

6.3.6 Interspecific comparison of the results

Important differences were observed between *C. protothecoides* and the two other species. Firstly, higher biomass productivity was obtained during the first stage of the process and a change in the color of the culture from green to orange was also observed. This change in color has been associated with NL accumulation (Xu et al., 2006), suggesting a higher initial NL cellular content in *C. protothecoides* mixotrophic cultures. On the other hand, *S. obliquus* and *A. convolutus* cells are known to have a low lipid content (< 10% of the dry weight) when cultivated under mixotrophic conditions (Chu et al., 1995; Girard et al., 2014).

Secondly, considering all the samples, the normalized mean cell fluorescence was 2 to 6 times higher in *C. protothecoides* cultures than the others. This difference could be due to experimental factors (differences in cell permeability to NR staining, difference in biomass density levels, etc...) and/or phylogenetic differences. In support of the latest, observation of NR stained cells by fluorescence microscopy suggested the presence of fewer but bigger lipid droplets in *C. protothecoides* cells compared to multiple small lipid droplets in *S. obliquus* and *A. convolutus* cells (Figure 6.3). It is known that repression of the major lipid droplet protein (MLDP) gene expression lead to an increase in lipid droplets size in *Chlamydomonas*

reinhardtii, without affecting the triacylglycerol cellular content (Moellering & Benning, 2010).

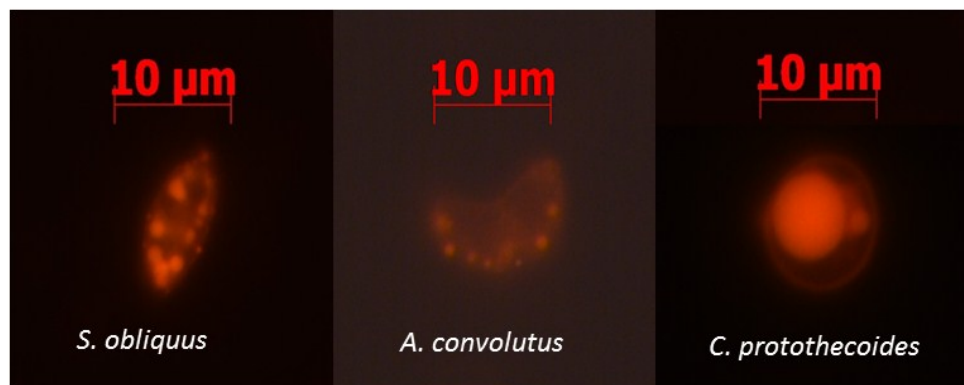


Figure 6.3 Nile red coloration of the three mixotrophic strains after the lipid accumulation stage

Thirdly, *C. protothecoides* is the only specie which showed important variations in NL cellular content in ultrahigh cell density cultures, i.e. $> 10 \text{ g dry cell mass L}^{-1}$ (Richmond, 2007), neutral pH (Table 6.5) and in absence of light (Figure 6.1 - heterotrophic models). The ability to accumulate NL under these conditions would be a major economic asset of the process, while less storage space and energy would be needed during the second stage of the 2SCP and subsequent harvesting of the biomass.

When considering *S. obliquus* and *A. convolutus* together, no significant NL accumulation could be obtained in the absence of light, and when light was present, at biomass densities higher than 2.4 g L^{-1} . This could suggest the existence of a threshold dose of light for NL accumulation to occur in both these members of the class Chlorophyceae. Indeed, as biomass density increases in a microalgae culture, light availability decreases because of mutual shading (Yen & Chiang, 2012). During the cell division stage, exponential growth occurs until this shading phenomenon reduces the light per cell regimen under a critical threshold, after which specific growth rate is reduced and cell mass continues to accumulate at a constant, linear rate (Richmond, 2007). In batch cultivation, when all nutrients are provided in sufficient

amount, this linear growth stage lasts until light per cell becomes overly low, or when some inhibitory activity or conditions arrest cell growth. The results obtained here suggest that, for *S. obliquus* and *A. convolutus*, the metabolism of NL accumulation could respond to different light-regimes, induced by different biomass density conditions, in a similar manner to the growth model just described. In other words, for an accumulation of intracellular lipid to occur, as for cell division to occur, a minimum dose of light must be provided to each cell. However, unlike for cell division, this light cannot be replaced by the addition of a DOC source in heterotrophic conditions. The frequency of the light-dark cycle, as determined by the length of the optical path and extent of culture turbulence, is also an important “light related parameter” to consider when determining the cell’s light-regime in high density culture (Richmond, 2007), and could as well play a role in NL accumulation.

Other biotic and abiotic conditions induced by high microalgal biomass densities include: accumulation of O₂ and depletion of CO₂ (photoautotrophy), depletion of O₂ and accumulation of CO₂ (heterotrophy) and accumulation of toxic metabolites. These factors could have also had an impact on NL accumulation. However, intra- and interspecific comparison of the results clearly demonstrate that light is a key parameter to consider for NL accumulation to occur in *S. obliquus* and *A. convolutus*. However, not all Chlorophyceae spp. require light to accumulate lipids. Recently, a strain of *Scenedemus* (R-16) was isolated which could accumulate high amounts of lipids (52.6% of its dry biomass) when 10 g L⁻¹ glucose was added to the culture medium under strict heterotrophic conditions (Ren et al., 2013). It therefore supports the observation made by others that lipid accumulation by heterotrophic microalgae is strain-dependent (Cheirsilp & Torpee, 2012).

6.4 Conclusion

Our results demonstrate that NL accumulation under heterotrophic conditions is a strain-dependent phenomenon. *C. protothecoides* showed a good potential for use in the 2SCP proposed here, because of its ability to accumulate lipids in ultrahigh cell density cultures and in absence of light. Conditions of high pH (≥ 9.5) and light were shown to be essential to obtain decent lipid productivity in *S. obliquus* and *A. convolutus* nitrogen starved cultures.

This light-dependent phenomenon should be investigated further by determination of the threshold dose of light, or biomass density, allowing NL accumulation to occur in these strains. Finally, other metabolic stresses or culture conditions, such as temperature and osmotic stresses, or even addition of algaecides in the medium should be tested for their potential to induce NL accumulation in these species under heterotrophic conditions.

CHAPITRE 7 Commensalisme dirigé entre *Scenedesmus obliquus* et *Chlorella protothecoïdes* : vers la viabilité économique d'un procédé de culture de microalgues mixo/hétérotrophes pour le biodiesel

Avant-propos

Auteurs et affiliation :

Jean-Michel Girard : étudiant au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Réjean Tremblay : professeur, Institut des Sciences de la Mer, Rimouski (Qc).

Nathalie Fauchoux : professeure, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Michèle Heitz : professeure, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Jean-Sébastien Deschênes : professeur, Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski.

Date de soumission :

Octobre 2014

Revue :

Bioresource Technology

Titre français :

Commensalisme dirigé entre *Scenedesmus obliquus* et *Chlorella protothecoïdes* : vers la viabilité économique d'un procédé de culture de microalgues mixo/hétérotrophes pour le biodiesel.

Contribution au document :

Cet article contribue à la thèse de deux façons. Tout d'abord, la possibilité d'utiliser le peroxyde d'hydrogène pour la stérilisation de milieux de culture de microalgues est décrite pour la première fois. Ensuite, une stratégie originale faisant intervenir deux espèces de microalgues différentes (commensalisme dirigé) est testée au laboratoire afin d'améliorer l'utilisation des sucres totaux contenus dans le perméat de lactosérum dans une optique de phycorémédiation de ce coproduit industriel. Cette stratégie permettrait également de diversifier la gamme de produits commerciaux pouvant être obtenus par bioraffinage en permettant la production de deux biomasses microalgales de compositions biochimiques différentes.

Résumé français :

L'inclusion d'une étape de culture mixo/hétérotrophe à l'intérieur d'un procédé industriel de production de biomasse microalgale permet d'augmenter considérablement la productivité des cultures. Toutefois, le contrôle des risques de contamination par d'autres microorganismes et l'assurance d'une utilisation efficace d'une source de carbone organique dissous (DOC) abordable sont des aspects importants à considérer dans ces conditions. Dans le présent travail, un milieu de culture composé de perméat de lactosérum a été volontairement contaminé par la bactérie *Escherichia coli*, puis stérilisé à l'aide d'un système peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)/catalase avant d'être inoculé avec deux espèces de microalgues en co-culture. Dans une autre expérience, le même milieu a été utilisé pour cultiver séquentiellement *Scenedesmus obliquus*, dans des conditions mixotrophes, suivi de *Chlorella protothecoïdes*, dans des conditions hétérotrophes, pour un rendement de conversion du lactose en biomasse de 45 % (m/m), et une consommation de 62% des sucres totaux en 34 jours. Nos résultats démontrent le potentiel du système H_2O_2 /catalase pour la culture de microalgues dans un sous-produit de l'industrie laitière et l'utilisation du commensalisme dirigé pour la production de biomasse microalgale.

Directed commensalism between *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella protothecoides*: towards the economic viability of a mixo/heterotrophic microalgae cultivation process for biodiesel

Jean-Michel Girard^{1,2,3}, Réjean Tremblay², Nathalie Fauchoux¹, Michèle Heitz¹, Jean-Sébastien Deschênes³

¹ Département de Génie Chimique et Génie Biotechnologique, Université de Sherbrooke
2500, boul. de l'Université, Sherbrooke (Québec) Canada, J1K 2R1;

²Institut des Sciences de la Mer,
310, allée des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1 ;

³Département de mathématiques, informatique et génie, Université du Québec à Rimouski,
300, allée des Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1;

Abstract

Inclusion of a mixo/heterotrophic culture stage in the design of industrial processes of microalgae biomass production can significantly increase crop productivity. However, adequate control of contamination risks by other microorganisms combined with an efficient use of an affordable dissolved organic carbon (DOC) source are important aspects to consider in these conditions. In the present work, a cheese whey permeate supplemented medium was voluntarily contaminated with the bacteria *Escherichia coli* and successfully decontaminated by a hydrogen peroxide (H₂O₂)/catalase system, before inoculation with two microalgae strains. In another experiment, the same medium was used to sequentially culture *Scenedesmus obliquus*, under mixotrophic conditions, followed by *Chlorella protothecoides*, under heterotrophic conditions, resulting in a 45% (w/w) conversion yield of lactose into microalgae biomass; and 62% consumption of the total lactose content in 34 days. Our results demonstrate the potential of the H₂O₂/catalase system for microalgae cultivation in a dairy industry byproduct and the use of directed commensalism for microalgae biomass production.

Keywords: Cheese whey permeate, hydrogen peroxide, FT-IR/ATR sugar monitoring, microalgae co-cultivation

7.1 Introduction

Phycoremediation is the process that converts nutrients and contaminants from industrial and municipal wastewaters into microalgal biomass. It allows the decontamination of these grey waters while producing biomass that has potential for many useful applications including energy and food production (Rawat et al., 2011). The development of such processes and scale-up have however met with mitigated success in the past as low productivity of such cultures can hardly justify for the costs associated with harvesting and dewatering of the biomass (Christenson & Sims, 2011). This low productivity can be attributable to low DOC content typically observed in these effluents, and to the presence of other microorganisms such as bacteria and fungi, which not only competes for available nutrients but also considerably reduces the fields of use of the biomass produced (Prajapati et al., 2013).

Reactive oxygen species like superoxide ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals ($\cdot OH$) can destroy most types of biomolecules unless instantaneously deactivated by suitable reduction mechanisms. Although the use of H_2O_2 as a preservative agent of milk and derivatives have been greatly reduced or completely eliminated 50 years ago, its bactericide power and ease of use has long been recognized (Lück, 1966). Whey is an important co-product of the cheese industry that possesses a substantial polluting power, with a biochemical oxygen demand (BOD) some 175-fold higher than typical sewage effluent (Smithers, 2008). This is due to its high DOC content which is mainly lactose (> 75% of total solids). Whey proteins represent approximately 10% of total solids and include β -lactoglobulin, α -lactalbumin, the heavy and light chains immunoglobulins, bovine serum albumin, lactoferrin, lactoperoxidase and glycomacropeptide. These proteins are already used as additives in dairies and other food products and are recognized for their nutritive qualities and health benefits (Solak & Akin, 2012). During the process of whey protein isolation, a lactose concentrate is produced (also called “whey permeate (WP)”) as a result of an ultrafiltration step. We therefore suggested that WP, with its high DOC content (> 100 g lactose l^{-1}) and very low bacterial load (due to the ultrafiltration step) would be a good candidate for phycoremediation, and *Scenedesmus obliquus* was identified as a good candidate strain because of its ability to hydrolyse extracellular lactose (Girard et al., 2013).

Some limitations of the process included incomplete utilization of the DOC by the microalgal culture and necessity of an additional sterilisation step to completely eliminate bacteria before use as a microalgal culture medium. On a large scale, these limitations would translate in high residual lactose content in the sewage effluent and important additional costs of sterilisation of the culture medium. Moreover, the low lipid content observed in the WP grown *S. obliquus* biomass would greatly limit its use as a feedstock for biodiesel production (Girard et al., 2014). To address these concerns, we tested two hypotheses: 1) the use of a hydrogen peroxide (H_2O_2)/catalase decontamination system would be sufficient to eliminate the bacteria from the culture medium, and 2) the co-cultivation or sequential cultivation of *S. obliquus* and *C. protothecoides* could improve total lactose consumption and increase lipid productivity of the cultures.

7.2 Material and methods

7.2.1 Culture maintenance and medium

Scenedesmus obliquus was obtained from the Canadian Phycological Culture Center in Waterloo, Canada (CPCC 5) and *Chlorella protothecoides* from the collection of algae at the University of Texas (UTEX 255). Cultures were kept in heat sterilized (121°C, 15 min) Bold's Basal Medium (BBM), adjusted to pH 6.8 (Stein, 1973). For *C. protothecoides*, 1 g L⁻¹ soy protein peptone (Sigma-Aldrich) was added to the medium (BBMP). Cheese whey permeate (WP) was shipped on ice from a dairy transformation plant and filtered (0.2 µm) upon reception.

7.2.2 Experimental procedures

H₂O₂ decontamination of the culture medium and co-culture experiment

A schematic representation of the experimental design is presented in Figure 7.1. All tested conditions were performed in triplicate. The day before inoculation, 8 mL samples of cheese whey permeate (WP) were voluntarily contaminated with 0.01 mL of *E. coli* bacterial suspension in 50 mL Erlenmeyer flasks. Except for the “positive contamination control”, 0.05% (w/v) H_2O_2 was immediately added in all contaminated samples. After 24h incubation

at room temperature (day 0), different amounts (0, 0.25, 2.5 and 25 U mL⁻¹) of bovine catalase (Sigma-Aldrich) were added, and incubated at room temperature for 30 minutes to neutralize H₂O₂ toxicity. Following this treatment, 7 mL of fresh BBM was added to each culture before inoculation with *S. obliquus* (5 mL of a culture in exponential stage of growth) for an initial volume of 20 mL and initial medium composition of 60% (v/v) BBM and 40% (v/v) WP. The cultures were incubated at 22.5°C with continuous orbital agitation (120 rpm) and continuous illumination (100 µE m⁻² s⁻¹). Microalgal growth was monitored by sampling 0.5 mL of culture and subsequent spectrophotometric measure of the absorbance at 750 nm with a fixed wavelength DU640 UV-visible spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, BC, CA) in 1 cm cuvetts.

At day 4 of the experiment, one culture set was inoculated with *C. protothecoides* (5 mL of a culture in exponential stage of growth) and supplemented with 2 g L⁻¹ soy protein peptone. In the “non-contaminated control”, the *C. protothecoides* inoculum was replaced by 5 mL of BBMP. The cultures were sampled (0.5 mL) each week during six weeks. Samples were centrifuged (5 min, 10 000 g) and supernatants were kept at -20°C until sugar determination by infrared absorbance spectra acquisition as previously described (Girard et al., 2013). At the end of the experiments, fresh culture samples (0.5 mL) were diluted to 1 x 10⁶ cells mL⁻¹ in Tris-buffered Saline (TBS). These solutions were passed into an Epics Altra flow cytometer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, BC, CA) fitted with a 488 nm laser operated at 18 mW. The rest of the biomass was harvested by centrifugation (5 min, 3 500 g). Pellets were washed once with deionized water and then freeze-dried. To eliminate the bias that may have been introduced by variation of volume due to evaporation, the final volume was determined theoretically: 20 mL (initial volume) – 5 mL (sample volume) = 15 mL (final volume). Final yields were determined gravimetrically and expressed in g L⁻¹.

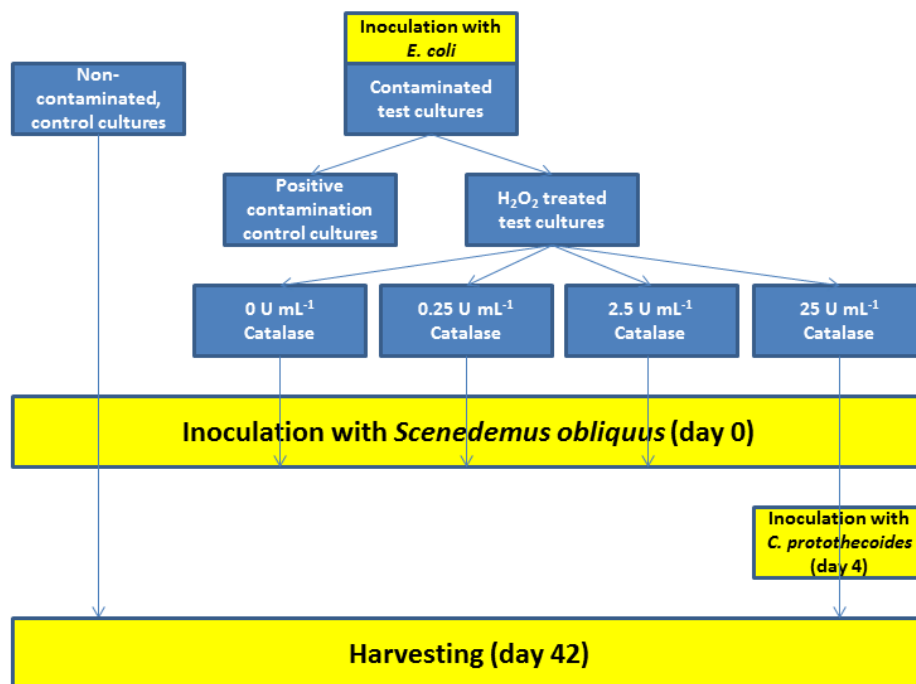


Figure 7.1 Experimental design of the H₂O₂/catalase and co-culture experiments.

Sequential microalgae culture experiment

A schematic representation of the experimental design is presented in Figure 7.2. At day 0 of the experiment, five sets of triplicate (#1 to #5) were inoculated with *S. obliquus* (1.4 mL of a culture in exponential stage of growth) for an initial volume of 10 mL and initial medium composition of 60% (v/v) BBM and 40% (v/v) WP. The cultures were incubated at 22.5°C with continuous orbital agitation (120 rpm) and continuous illumination (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). At day 0 and each week during four weeks a set of triplicate was harvested by centrifugation (5 min, 3500 g). The supernatants of this centrifugation were transferred aseptically in sterile centrifugation tubes and kept at -20°C until further use. The pellets were used to determine the final *S. obliquus* dry biomass yields.

All the supernatants from the precedent step were thawed and volumes were readjusted to 10 mL (initial volume) using sterile deionized water to compensate for evaporation. These media were inoculated with *C. protothecoides* (0.5 mL of a culture in exponential stage of growth) and supplemented with 4 g L⁻¹ soy protein peptone. The cultures were incubated at 22.5°C

with continuous orbital agitation (120 rpm) in continuous darkness (heterotrophy) during 6 days. At the end of this incubation, the biomass was harvested by centrifugation (5 min, 3 500 g). The supernatants were kept frozen at -20°C until acquisition of their infrared absorbance spectra. The pellets were used to determine the final *C. protothecoides* dry biomass yields.

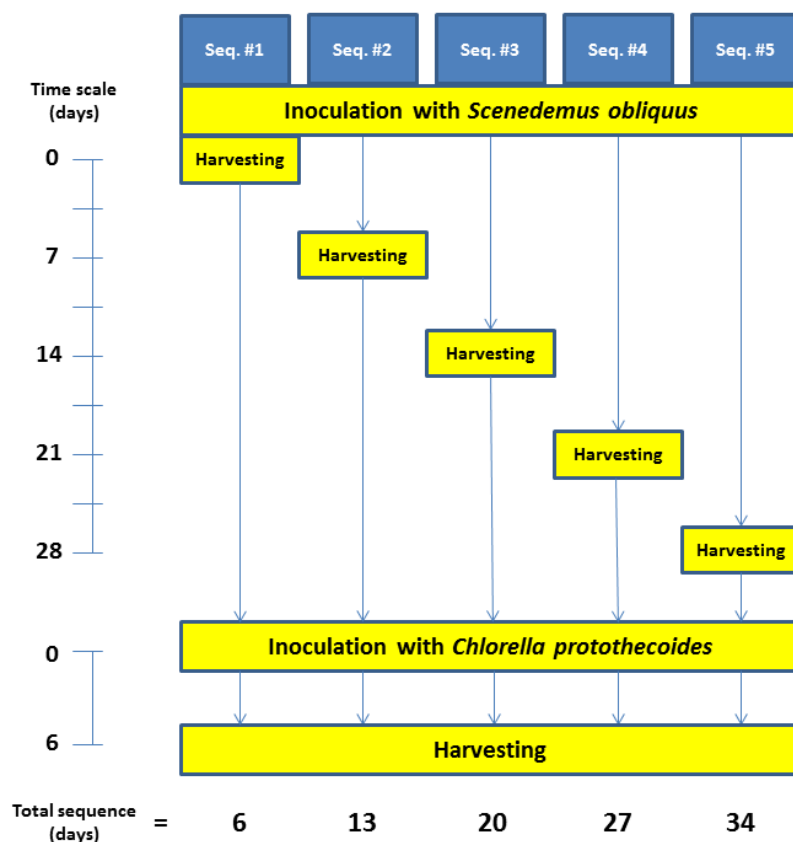


Figure 7.2 Experimental design of the sequential culture experiments.

7.2.3 Data analysis

The differences in final culture yield and residual sugars (g L^{-1}) were analyzed: 1) by Student's *t*-test on biomass yields of the “co-culture experiment”, and 2) by an analysis of variance (ANOVA) on biomass yields and on the residual sugars of the “sequential experiment” ($n=3$). Effect of catalase treatment have been analysed by a two-ways ANOVA with catalase concentrations and culture time as factors. Variation in sugar proportions was

also analysed by two-ways ANOVA. Where differences were detected, posteriori Student-Newman-Keuls (SNK) multiple comparison tests were used to determine which means were significantly different. The normality was verified by a Shapiro-Wilk test and the variances homoscedasticity through direct observations of residuals. If necessary, data were log+1 or arcsine square-root (for % data) transformed to achieve homogeneity of variances. Analyses were carried out using SAS v.9.2 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

7.3 Results and discussion

Our previous work demonstrates the capacity of *S. obliquus* to hydrolyze extracellular lactose in a WP supplemented culture medium and thus induce the accumulation of glucose and galactose in the medium (Girard et al., 2013). To further characterize this phenomenon, two sets of experiments were conducted by co-cultivating *S. obliquus* with *C. protothecoides*, a well-known heterotrophic microalgae specie with high potential for biodiesel production but unable to use lactose for growth (Girard et al., 2014),.

7.3.1 Simultaneous co-cultivation of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella protothecoides* in a H₂O₂ decontaminated culture medium

In the first experiment, prior to inoculation with the microalgae, the WP samples were voluntarily contaminated with *E. coli*, a bacterium well known for its ability to grow on lactose (Jacob & Monod, 1961). In the samples that were not H₂O₂-treated, significant bacterial growth could be observed by important opacification of the medium (not shown), whereas all the H₂O₂-treated samples remained clear and unclouded after 24h incubation at room temperature. Four different concentrations of bovine catalase were then added to the H₂O₂-treated samples before inoculation with *S. obliquus*. Microalgal growth occurred only at the two highest catalase concentration tested (2.5 and 25 U mL⁻¹) indicating that the catalase treatment using less than 2.5 U mL⁻¹ was not sufficient to neutralize all the H₂O₂ and prevent its lethal effect on *S. obliquus* cells. This result is in agreement with the H₂O₂ toxicity on this microalgae specie described in the literature (Mallick et al., 2002). Culture growth was monitored by absorbance at 750 nm during the first 4 days. No significant difference was

found between the treatment using the highest concentration of catalase (25 U mL⁻¹) and the non-contaminated control cultures ($F_{(1)} = 0.28$, $p = 0.61$), and only the time of incubation was significant ($F_{(2)} = 8684.8$, $p < 0.001$) (Figure 7.3).

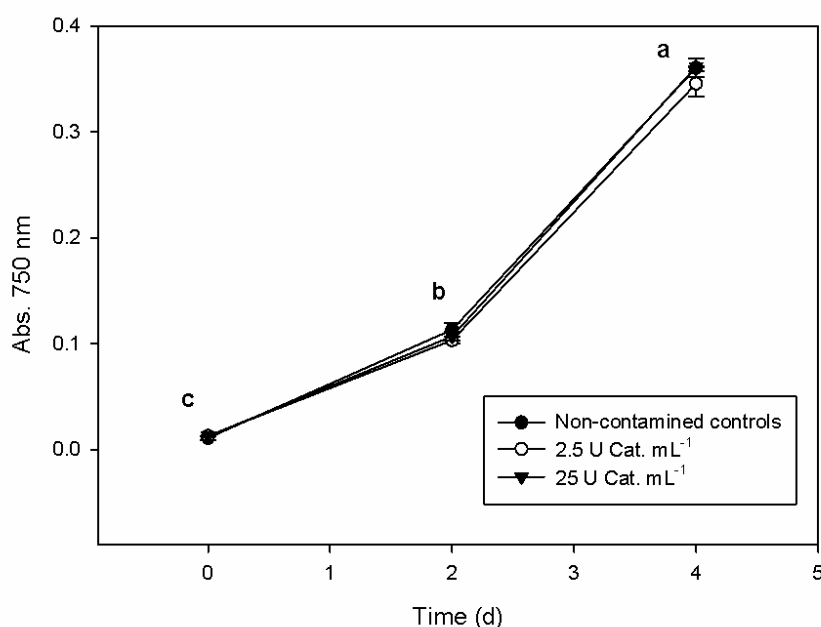


Figure 7.3 Absorbance at 750 nm of *S. obliquus* cultures after H₂O₂/catalase (cat.) treatment vs non-contaminated control cultures. Results are expressed as the mean±SD (n=3). Different letters indicate significant difference ($p < 0.001$).

S. obliquus was then cultivated either alone, or in co-culture with *C. protothecoides*, under mixotrophic conditions for six weeks. Figure 7.4 presents the proportions of lactose, glucose and galactose, as % of the total, present in the culture medium over the course of the experiments for the two tested conditions. These proportions were estimated from the infrared absorbance spectra of the solutions and using our previously described FT-IR/ATR multivariate model (Girard et al., 2013). As expected, an important glucose and galactose accumulation was observed in homogenous *S. obliquus* cultures, concomitant with a decrease in lactose proportion. However, when *Chlorella protothecoides* was present, the proportion of each individual sugar remained stable during the whole experiment, with lactose representing

$\geq 96\%$ of total sugars at all time. One possible explanation for this phenomenon is that the *Chlorella* cells have consumed the glucose and galactose resulting from the extracellular hydrolysis of lactose by *S. obliquus*. In ecology, this type of interaction between two different species is called commensalism.

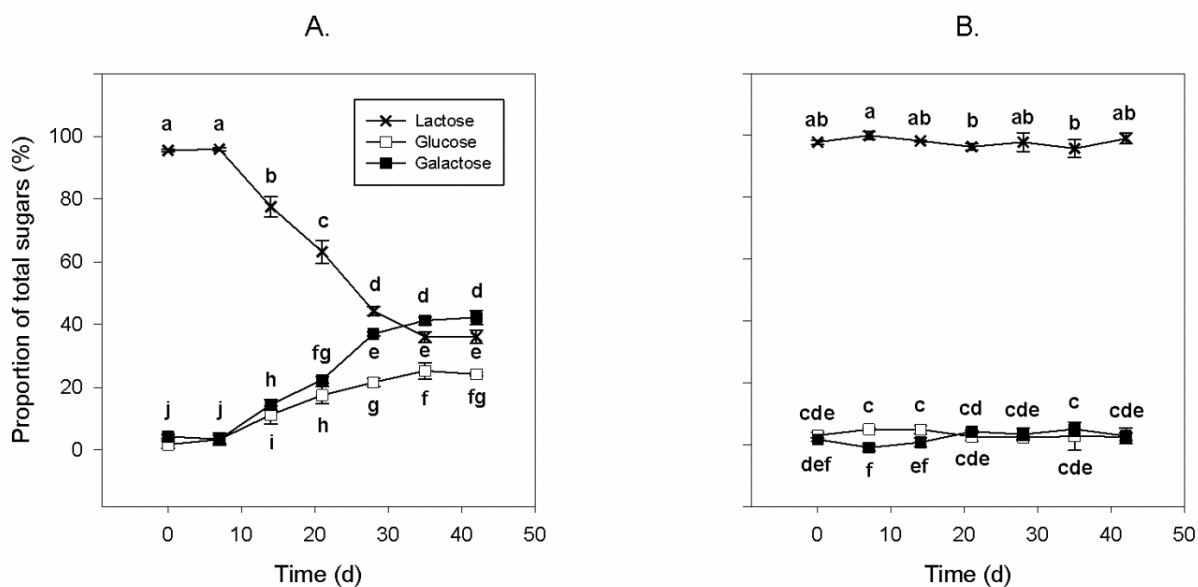


Figure 7.4 Proportion (%) of lactose, glucose and galactose present in the culture medium of *S. obliquus* cultivated alone (A) or in co-culture with *C. protothecoides* (B). Results are expressed as the mean \pm SD (n=3). Different letters indicate significant difference in sugar concentration ($p < 0.05$).

Final dry biomass yields were significantly different at 7.3 ± 0.3 and 10.6 ± 0.6 g L⁻¹ for homogenous *S. obliquus* cultures and heterogeneous *S. obliquus* + *C. protothecoides* cultures respectively ($T_{(1.3)} = -7.99$, $p = 0.045$). This increase in yield (45%) can be due to soy protein peptone supplementation and/or presence of *C. protothecoides*. The presence of both species in the heterogeneous cultures was confirmed by phase contrast microscopy (figure 7.5). However, the two cell populations could not be discerned by passage into a flow cytometer, indicating similar cell granularity, fluorescence and size. An additional technique, such as specific surface markers, should therefore be used in combination with flow cytometry to allow distinguishing the two species if necessary in subsequent experiments.

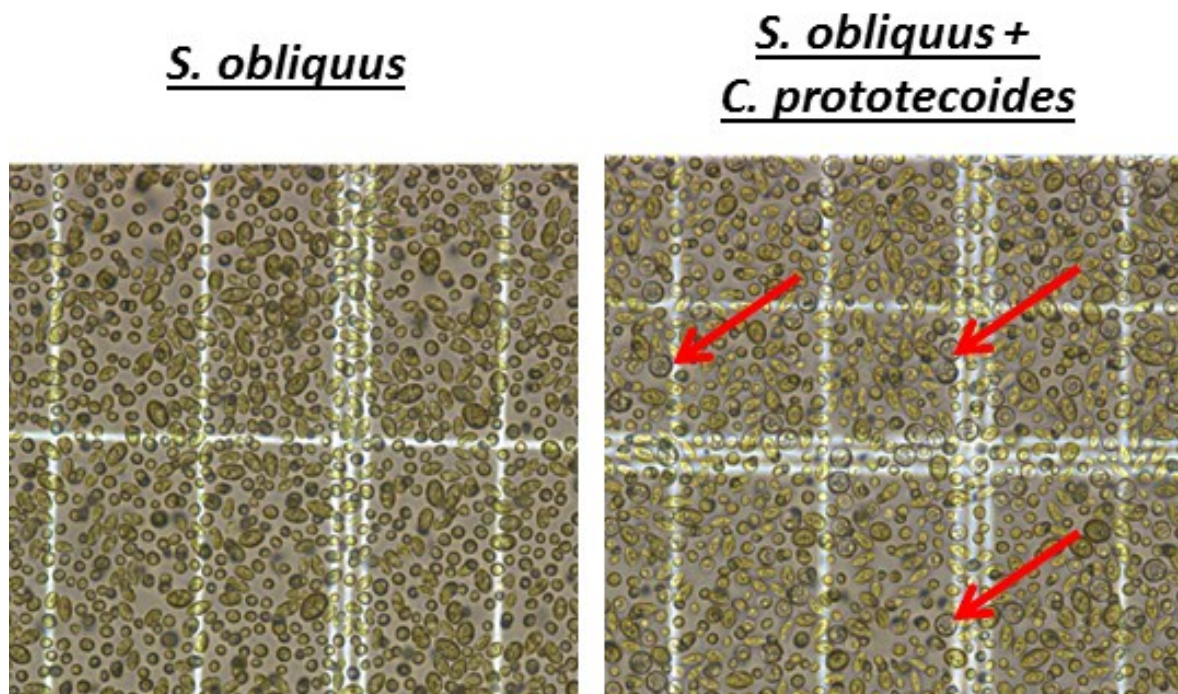


Figure 7.5 Phase contrast microscopy of homogeneous (*S. obliquus*) or heterogeneous (*S. obliquus* + *C. protothecoides*) microalgal cultures. Red arrows point at *C. protothecoides* cells characterized by larger and round cells.

7.3.2 Sequential cultivation of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella protothecoides* on cheese whey permeate

1st stage : mixotrophic production of S. obliquus

In the second experiment, *S. obliquus* was first cultivated mixotrophically in the WP supplemented medium for different periods of time (0, 7, 14, 21 and 28 days) and then harvested by centrifugation. Here again, the proportions of lactose, glucose and galactose in the culture medium were estimated using our FT-IR/ATR multivariate model and results were similar to those presented in Figure 7.4-A. The accumulation of monosaccharides in the culture medium resulting from the extracellular hydrolysis of lactose reached 15 ± 1 % for glucose and 33 ± 3 % for galactose at day 28, while biomass yield reached 6.8 ± 0.2 g L⁻¹

(Table 7.1). Table 7.2 presents the main statistical results of the analyses of variance performed to detect significant differences in biomass yields.

Table 7.1 Biomass yields of the sequential experiment. Different letters indicate significant difference in biomass yield ($p < 0.05$) for each stage and the total. ND = not determined.

	1st stage		2nd stage		Total	
	<i>S. obliquus</i>		<i>C. protothecoides</i>			
	Residence time (d)	Yield (g L ⁻¹)	Residence time (d)	Yield (g L ⁻¹)	Residence time (d)	Yield (g L ⁻¹)
Seq. #1	0	0.2 ± 0.1 ^e	6	ND	6	ND
Seq. #2	7	3.1 ± 0.1 ^d	6	ND	13	ND
Seq. #3	14	4.7 ± 0.1 ^c	6	5.0 ± 0.2 ^b	20	9.7 ± 0.1 ^c
Seq. #4	21	6.0 ± 0.1 ^b	6	6.0 ± 0.2 ^a	27	12.0 ± 0.2 ^b
Seq. #5	28	6.8 ± 0.2 ^a	6	6.2 ± 0.4 ^a	34	13.0 ± 0.3 ^a

Table 7.2 Analysis of variance (ANOVA) of the biomass yields of the sequential experiment.

Biomass	Sum of squares	df	Mean square	F value	p value
<u><i>S. obliquus</i></u>					
Model	64.65	4	16.16	1390.08	< 0.0001
Error	0.10	9	0.01		
Corrected total	64.76	13			
<u><i>C. protothecoides</i></u>					
Model	1.85	2	0.92	10.95	0.015
Error	0.42	5	0.08		
Corrected total	2.27	7			
<u>Total</u>					
Model	13.11	2	6.56	108.29	< 0.0001
Error	0.30	5	0.06		
Corrected total	13.42	7			

2nd stage : heterotrophic production of C. protothecoides

After harvesting of the *S.obliquus* biomass by centrifugation, the culture media were transferred aseptically into sterile culture flasks. These media were then inoculated with *C.*

protothecoides and cultivated heterotrophically for 6 days. Overall, these experiments produced 5 different sequences of cultivation involving 0 to 28 days of *S. obliquus* residence time and 6 days of *C. protothecoides* residence time for a total of 6 to 34 days (Table 7.1). The highest *C. protothecoides* biomass yields were obtained with culture media with a *S.obliquus* residence time of 21 and 28 days and highest monosaccharides content.

Estimation of the proportions of lactose, glucose and galactose present in the final culture media showed that the glucose and galactose made available during the first stage had been totally consumed and lactose represented $\geq 98\%$ of total sugars in all cases. A quantitative estimation of the residual lactose was therefore performed using our FT-IR/ATR univariate model (Girard et al., 2013) and showed significant differences between sequences ($F_{(4)} = 194.5$, $p < 0.0001$) (Figure 7.6). Sequence #5 presented the highest lactose consumption (62% of total) and highest total biomass yield (13 g L^{-1}), resulting in a 45% “lactose-to-biomass” conversion yield.

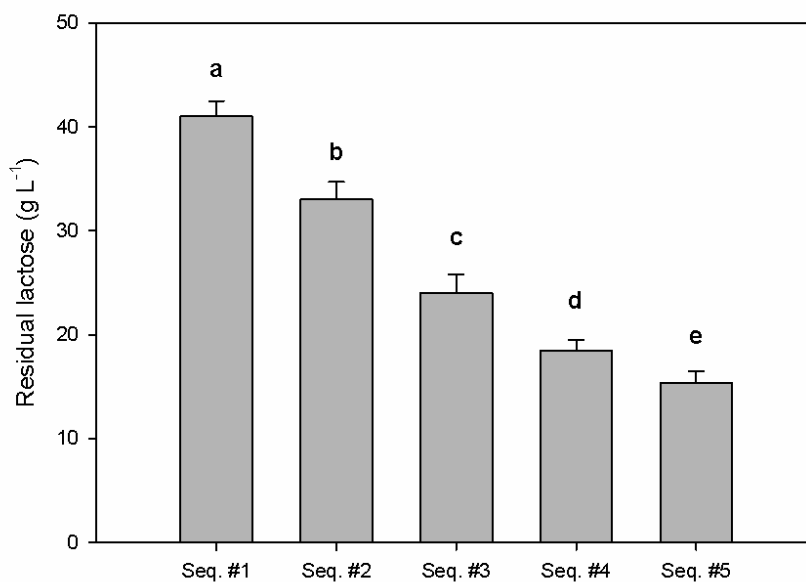


Figure 7.6 Residual lactose present in the culture medium at the end of the 5 sequential culture experiments. Results are expressed as the mean \pm SD (n=3). Different letters indicate significant difference in sugar concentration ($p < 0.001$).

Concerning microalgal biodiesel, value added options must be found for the lipid extracted biomass in order to make the whole process viable economically. A number of options implying biorefining the biomass are currently under study to diversify the catalogue of commercial products that can be obtained from a single microalgal biomass feedstock (Yen et al., 2013). This catalogue could include antioxidant pigments, specialized lipids and proteins that could serve as a source of functional food. Therefore, although “food grade installations and ingredients for food grade products” may imply higher initial costs, it could also translate into greater chances to make this industry possible in the short terms.

7.4 Conclusion

The culture strategies tested here demonstrate the possibility to perform phycoremediation of cheese whey permeate for the production of two different microalgal biomass feedstock by sequential culture. The glucose and galactose resulting from the extracellular lactose hydrolysis performed by the *S. obliquus* culture was completely consumed by the *C. protothecoides* culture. Also, we demonstrated that hydrogen peroxide could be used to decontaminate the culture media used in the process.

CHAPITRE 8 Conclusion et perspectives

L'objectif général du présent travail est le développement d'un procédé de culture de microalgues à grande échelle pour l'industrie du biodiesel. La littérature scientifique sur ce sujet n'a cessé de s'accumuler à un rythme élevé pendant tout le déroulement du projet (2010-2014). Ceci est représentatif du vif intérêt de la communauté scientifique et des secteurs privés et institutionnels pour l'innovation dans le domaine des technologies vertes pour la production de carburants renouvelables, qui permettront éventuellement de palier à l'épuisement des énergies fossiles utilisées actuellement. Il semble toutefois peu probable que ces énergies puissent être complètement remplacées à courts ou moyens termes, principalement pour des raisons de coûts de production et de volume d'utilisation à l'échelle planétaire. Toutefois, les stratégies actuellement déployées par certains gouvernements de légiférer pour le remplacement graduel des combustibles fossiles permettront de réduire les impacts sociaux et économiques suivant l'avènement du pic pétrolier. Par exemple, depuis le 1^{er} juillet 2011, tout carburant diesel vendu au Canada doit posséder une teneur moyenne annuelle de 2% de biodiesel (Canada, 2010). Ces politiques sont essentielles à la poursuite de la recherche dans le domaine des bioénergies et les cibles devront être constamment mises à jour afin d'assurer que les infrastructures de production d'énergies renouvelables alternatives soient adéquates tout au long de la déplétion du pétrole.

Divers paramètres du procédé de culture de microalgues à développer ont été déterminés en amont des essais expérimentaux afin de jeter les bases des travaux à réaliser. Les choix effectués tiennent compte des contextes géographique et technique de l'emplacement de l'éventuelle usine de production (Québec, Canada) et sont présentés dans le tableau 3.1. Notamment, l'utilisation de PBR permet d'envisager une production continue même en hiver, contrairement aux étangs. Aussi, la sélection d'espèces de microalgues mixotrophes permet de réduire la dépendance des cultures à la lumière. Sur le plan industriel, les principaux avantages de cultiver des microalgues en mode nutritif mixo/hétérotrophe est l'augmentation de la productivité des cultures et la phycoremédiation d'effluents industriels riches en DOC permettant du même coup de réduire les coûts de la source de carbone organique et des nutriments nécessaires. Le principal désavantage est l'augmentation considérable du risque de

contamination des cultures par d'autres microorganismes hétérotrophes tels les bactéries, les levures et les champignons.

L'utilisation du perméat de lactosérum comme source de DOC pour la culture de microalgues mixo/hétérotrophes à l'échelle industrielle présente plusieurs avantages comparativement à d'autres effluents industriels ou à des eaux usées municipales (Bhatnagar et al., 2011). D'abord, cette matière résiduelle industrielle contient une haute concentration en sucre ($>100 \text{ g L}^{-1}$). Ceci permettrait dans un premier temps, de réduire grandement les coûts de transport, si nécessaire, entre les usines de traitement de lactosérum et l'emplacement de l'usine de culture microalgale comparativement à d'autres rejets liquides possédant une faible concentration en DOC. Il serait toutefois envisageable et potentiellement avantageux d'intégrer les infrastructures de production de microalgues directement sur les sites de production de perméat de lactosérum (figure 8.1) (Fortier & Sturm, 2012). Dans un deuxième temps, cette haute concentration en DOC permet théoriquement d'obtenir des cultures possédant une densité de biomasse très élevée ($\geq 50 \text{ g L}^{-1}$ ou 5% m/v) (Bumbak et al., 2011). En plus de réduire grandement les coûts reliés à la manutention des liquides (brassage, pompage, etc...) ceci simplifie également la récolte de la biomasse comparativement à des cultures photoautotrophes qui présentent couramment des rendements 100 fois inférieurs (Xu et al., 2011). Certaines technologies de traitement de la biomasse telles le séchage par pulvérisation et la liquéfaction hydrothermique peuvent utiliser comme intrant direct des solutions à 10% m/v de solides dissous. Il suffirait donc de concentrer la biomasse d'un facteur 2, par centrifugation ou par osmose inverse par exemple, pour rendre possible l'utilisation de telles technologies en aval du procédé de culture.

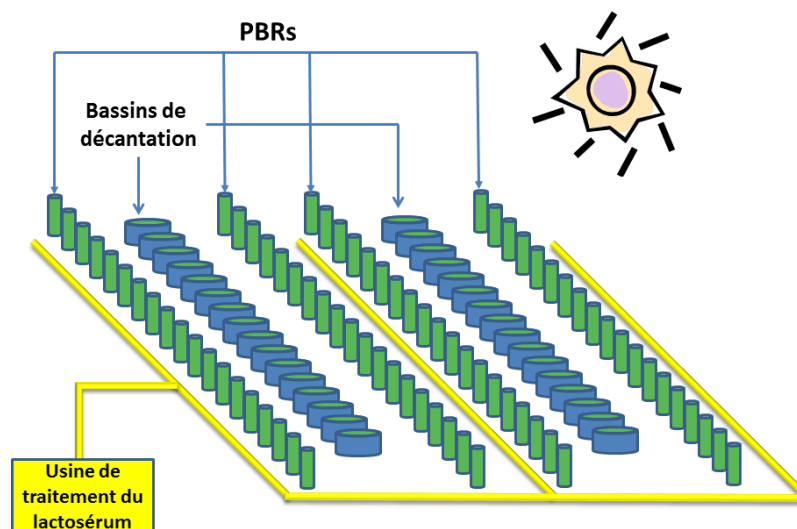


Figure 8.1 Schéma du procédé de production de microalgues mixotrophes par l'utilisation du perméat de lactosérum

Ensuite, le perméat de lactosérum contient plusieurs autres nutriments essentiels à la croissance des microalgues (Tableau 4.1). La simple présence de ces nutriments a permis d'améliorer le rendement de cultures de *Chlorella vulgaris*, une espèce incapable d'utiliser le lactose comme source de DOC (Abreu et al., 2012). Ce phénomène pourrait également être dû à la présence d'autres facteurs de croissance dans le lactosérum. Il est toutefois à noter que la concentration en azote, sous forme d'ammonium (NH_4^+), ne serait pas suffisante pour soutenir les rendements théoriques décrits ci-dessus. Une autre source d'azote abordable, telle les résidus solubles de la distillation du maïs (Silva et al., 2010), doit donc être envisagée. Dans le cadre d'un procédé de cultures de microalgues oléagineuses impliquant une phase d'accumulation lipidique induite par une carence en azote, le fait de pouvoir contrôler la concentration initiale de ce nutriment est cependant un avantage considérable. Aussi, d'autres avenues de valorisation devront être explorées pour les nutriments présents en excès dans le perméat de lactosérum, principalement le phosphore (PO_4^{3-}), le chlore (Cl^-) et le potassium (K^+).

Finalement, le perméat de lactosérum est un produit de grade alimentaire débarrassé de la grande majorité de ses contaminants microbiens grâce à l'étape d'ultrafiltration nécessaire à la séparation des protéines. En effet, l'avenue de valorisation actuellement favorisée pour le

lactosérum passe d'abord par la séparation des protéines. Ces protéines de lactosérum sont utilisées comme additif dans des produits destinés à l'alimentation humaine et possèdent des effets bénéfiques pour la santé (Solak & Akin, 2012). Le perméat de lactosérum est donc le produit secondaire de cette étape de séparation et des avenues de valorisation sont actuellement recherchées pour ce concentré de lactose (Smithers, 2008). Dans l'optique où un procédé de production de biodiesel microalgal doit nécessairement engendrer un ou des coproduits à haute valeur commerciale pour atteindre la rentabilité (Williams & Laurens, 2010), l'utilisation d'une telle matière résiduelle permet d'envisager des coproduits de grade alimentaire, telles que des protéines microalgales pouvant être utilisées dans l'alimentation humaine (Becker, 2007).

Les essais effectués à l'échelle laboratoire ont permis de sélectionner une souche de microalgue pour le procédé et d'optimiser certains paramètres pour la production de biomasse en mode mixo/hétérotrophe ainsi que pour l'accumulation de lipides neutres par cette souche. Dans un sens plus large, les travaux ont permis d'accumuler de l'information sur dix espèces de microalgues.

L'étape de la sélection d'une souche a en effet permis de mettre en lumière plusieurs des forces et des faiblesses de ces dix espèces pour une culture industrielle dans le cadre déterminé par notre procédé. Notamment, il a été démontré que différents facteurs devaient être considérés lors du choix de la souche de microalgue à favoriser. Le processus de sélection présenté au chapitre 3 permet d'établir une stratégie solide pour le choix de ces facteurs et la détermination de leur importance relative. Cette méthode a entre autres permis de démontrer que la productivité lipidique en TAG, souvent considérée comme le principal critère de sélection de souche pour le biodiesel (Griffiths & Harrison, 2009), n'était pas le seul facteur à considérer. Par exemple, lors d'expériences menées en conditions photoautotrophes, la souche *Nannochloropsis oculata* CCMP-525 a présenté la plus haute productivité en TAG parmi les dix souches testées ($17 \text{ mg L}^{-1} \text{ jour}^{-1}$). Cependant lors du classement final, cette souche s'est classée en troisième place principalement à cause du profil lipidique de ses huiles mal adapté à la production de biodiesel, de son faible potentiel de sédimentation naturel et de la méconnaissance de sa capacité à utiliser des sources de DOC d'origines industrielles pour sa

croissance comparativement à la souche *Scenedesmus obliquus* CPCC-5. Il est à noter que ces expériences ont permis d'enregistrer le plus haut contenu lipidique jamais recensé pour cette dernière espèce (61.9%), la marque précédente étant de 58,3% (Mandal & Mallick, 2009). Cette accumulation lipidique est possiblement due à l'épuisement des réserves d'azote contenues dans le milieu de culture par la culture de microalgues. Toutefois, le faible contenu en TAG de l'extrait lipidique total (37%) a résulté en une productivité de lipides d'intérêt de seulement 6 mg L⁻¹ jour⁻¹, d'où l'importance de pousser les analyses jusqu'à la détermination des classes lipidiques présentes dans l'extrait total (voir figure 2.5). À la fin de ce processus de sélection, quatre souches de microalgues d'eau douce ont été retenues pour les travaux subséquents (*Scenedesmus obliquus* CPCC-5, *Scenedesmus acutus* CPCC-10, *Chlorella vulgaris* UTEX-2714, et *Chlorella protothecoides* UTEX-255). Les souches marines *Nannochloropsis oculata* CCMP-525 et *Phaeodactylum tricornutum* CCMP-632 n'ont pas été retenues pour deux raisons techniques. D'abord, l'utilisation d'eau de mer provoque une usure prématurée des systèmes de production et cette option n'a pas été considérée viable économiquement dans notre contexte particulier. Ensuite, les espèces marines produisent typiquement des huiles végétales composées d'une grande proportion d'PUFA (voir section 2.5.3). Ce profil lipidique a un impact négatif sur plusieurs propriétés physicochimiques du biodiesel résultant, notamment l'indice de cétane, l'indice d'iode et la stabilité oxydative; ce qui ne permet pas d'obtenir un produit final répondant aux normes américaine et européenne EN 12214 ou ASTM D6751.

Le principal DOC contenu dans le perméat de lactosérum est le lactose (> 80% des solides dissouts). L'utilisation du lactose par les organismes vivants dépend de leur capacité à synthétiser un transporteur transmembranaire, comme une lactose perméase, ainsi qu'une enzyme de la famille des β -galactosidase qui permettent respectivement l'internalisation et l'hydrolyse de ce disaccharide. Chez la bactérie *E. coli*, l'opéron lactose régule l'expression de ces enzymes qui dépend à la fois de la disponibilité du lactose et de l'absence de glucose dans le milieu de culture (Jacob & Monod, 1961). D'autre part, certaines β -galactosidases peuvent être sécrétées à l'extérieur de la cellule. Dans ces conditions, ce sont les molécules de glucose et de galactose résultant de l'hydrolyse extracellulaire du lactose qui doivent être internalisées. Chez la microalgue *Chlorella kessleri*, les transporteurs transmembranaire HUP1 et HUP2

permettent cette internalisation mais possèdent des affinités différentes pour le glucose et pour le galactose (Stadler et al., 1995). Certaines mutations ponctuelles sur le gène HUP1 (Q298N et N436Q) permettent toutefois de moduler cette affinité (Will et al., 1998).

Des travaux ont permis de démontrer l'existence d'activité β -galactosidase endogène chez plusieurs espèces de plantes et de microalgues marines et d'eau douce (Davies et al., 1994; Dwevedi & Kayastha, 2010). Trois des quatre souches retenues dans le cadre de nos travaux font partie de ce nombre. Cependant, nos résultats démontrent que seules les souches *Scenedesmus obliquus* CPCC-5, *Scenedesmus acutus* CPCC-10 peuvent croître en présence de lactose en conditions hétérotrophes (figure 4.1). Ces résultats s'accordent tout de même avec ceux de Davies et al. 1994, puisque leurs résultats ont montré une activité β -galactosidase 400 fois supérieure chez *Scenedesmus obliquus* comparativement à celle observée chez *Chlorella vulgaris* et *Chlorella protothecoïdes*. D'autres expériences ont toutefois démontré que le glucose permet d'obtenir des résultats 10 fois supérieurs à ceux obtenus avec le lactose en ce qui a trait au rendement des cultures de *Scenedesmus* (résultats non présentés). À la suite des expériences de croissance menées en présence de lactose pur, seule la souche *Scenedesmus obliquus* CPCC-5 a été retenue pour la suite des travaux.

Deux des principaux paramètres à considérer pour l'optimisation des conditions de culture pour la production de biomasse de *S. obliquus* en mode mixo/hétérotrophe en présence de perméat de lactosérum sont l'effet de la lumière sur la productivité des cultures et la concentration en sucres permettant une croissance optimale. Ces aspects ont été abordés au chapitre 4 du présent manuscrit. Des expériences menées en conditions mixotrophe vs hétérotrophe ont permis de démontrer un effet positif de la présence de lumière sur le taux de croissance spécifique et le rendement des cultures. Ces résultats ont d'ailleurs permis d'ajouter l'espèce *S. obliquus* à la liste des espèces pour lesquelles un effet additif des métabolismes photoautotrophe et hétérotrophe est observé. Cette liste compte déjà les espèces *Chlorella vulgaris*, *Chlorella regularis*, *Haematococcus pluvialis*, *Spirulina platensis* et *Euglena gracilis* (Ogbonna et al., 2002). Ce phénomène pourrait être dû à divers paramètres. Il a entre autres été observé que chez *C. vulgaris*, les taux d'internalisation du glucose et de consommation d'oxygène étaient les mêmes en présence et en absence de lumière (Martinez & Orus, 1991).

Ceci suggère que les deux métabolismes peuvent fonctionner en parallèle sans être affectés l'un par l'autre. De même, en conditions mixotrophes, le CO₂ produit par le métabolisme hétérotrophe lors de la respiration cellulaire peut être directement utilisé par le métabolisme photosynthétique (Ogawa & Aiba, 1981). Dans cette optique, la complémentarité des métabolismes de la photosynthèse et de la respiration cellulaire par l'utilisation de l'oxygène produit dans l'un et consommé dans l'autre, ainsi que le cycle du CO₂ suivant la voie inverse, pourrait contribuer à optimiser les taux de production de biomasse ainsi qu'à stabiliser le pH de cultures à grande échelle. En effet, le pH est un bon indicateur permettant de suivre l'activité des différents métabolismes. Le métabolisme autotrophe provoque une alcalinisation à cause de la consommation du CO₂ gazeux, tandis qu'en mode hétérotrophe, c'est l'inverse, et le milieu se voit acidifié par le CO₂ produit de la respiration. En mixotrophie, le pH de la culture varie selon la constituante dominante du métabolisme, mais dans la plupart des cas, il demeure approximativement constant (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004).

Lorsqu'une source de DOC exogène est assimilée par une cellule microalgale en conditions mixotrophe, celle-ci vient s'ajouter au pool de molécules organiques produites par la photosynthèse et disponibles pour la respiration cellulaire. Ainsi, afin qu'une stimulation de la croissance puisse être observée, la machinerie de respiration doit s'adapter pour être en mesure d'utiliser une plus grande quantité de carbone par unité de temps. Chez plusieurs espèces, cette stimulation de la respiration a été observée suite à l'ajout d'une source de carbone exogène en présence ou en absence de lumière (Lee, 2004a; Liu et al., 2009). D'autres souches de *Chlorella* ont montré un taux de croissance mixotrophe, en présence de glucose, supérieur à la somme des taux de croissance obtenus en autotrophie et en hétérotrophie (Lalucat et al., 1984; Orús et al., 1991). Ceci suggère plutôt une synergie entre les métabolismes. Lalucat et al., au cours d'une analyse bioénergétique extensive, ont démontré une diminution significative de la fraction d'énergie lumineuse utilisée pour la fixation de CO₂ dans les cellules mixotrophes. L'énergie lumineuse était plutôt utilisée comme source d'énergie pour l'assimilation de carbone organique. En effet, comme le ratio énergie-carbone, exprimé en kcal mol⁻¹, est plus élevé dans la biomasse microalgale que dans le glucose, il n'y a pas suffisamment d'énergie dans ce substrat organique pour supporter sa totale conversion en biomasse. Cette utilisation de l'énergie lumineuse permet donc une efficacité énergétique supérieure en réduisant la

quantité d'énergie perdue par dissipation et en augmentant l'efficacité photosynthétique. Ces travaux ont permis de conclure que la culture mixotrophe était le procédé le plus efficace de production de biomasse microalgale (Lalucat et al., 1984). En plus de permettre une productivité accrue, l'ajout d'une composante énergétique sous forme de lumière à de telles cultures entraîne la production de métabolites d'intérêt commercial dont l'expression est dépendante de la présence de lumière, tels que certains pigments photosynthétiques et vitamines (Ogbonna et al., 2002).

Plusieurs formes de DOC peuvent être utilisées par les microalgues. La capacité d'une espèce de microalgue à pouvoir utiliser une forme donnée dépend de la présence chez cette dernière, des gènes, ainsi que des mécanismes de régulation de leur expression, nécessaires au catabolisme de cette forme. Le glucose est la source de DOC la plus fréquemment utilisée en laboratoire dans les cultures mixotrophes. Il pénètre dans la cellule par transport actif via la protéine transmembranaire HUP1 (Hallmann & Sumper, 1996). L'ajout de glucose au milieu de culture de *Chlorella vulgaris* induit plusieurs changements métaboliques tels que : l'expression du gène *hup1* et une diminution du contenu cellulaire en chlorophylle (Perez-Garcia et al., 2011c).

L'intensité lumineuse joue également un rôle clé dans la stimulation de croissance pouvant être observée à l'intérieur de cultures mixotrophes. Dans des conditions de saturation lumineuse, le taux de croissance de cultures mixotrophes de *Scenedesmus* et de *Chlorella* est égal à celui obtenu en autotrophie (Combres et al., 1994b; Martínez et al., 1997). Dans ce cas, l'ajout d'une source de DOC permettrait de stimuler le taux de croissance seulement dans des conditions où la croissance est limitée par la lumière. Ceci pourrait être expliqué, entre autres, par le fait que le mécanisme d'absorption du glucose peut être inhibé par la lumière, chez certaines souches de *Chlorella* (Lee, 2004a).

Dans un autre cas d'étude, à partir d'une certaine intensité lumineuse, le taux de croissance de cultures mixotrophes était plus bas que le taux de croissance des cultures autotrophes soumises aux mêmes conditions (Ogawa & Aiba, 1981). Ceci pourrait être dû à la diminution du contenu cellulaire en chlorophylle observé dans des cultures mixotrophes de *Scenedesmus*

acutus et de *Phaeodactylum tricornutum*, alors que l'intensité lumineuse optimale (I_{opt}) est plus basse que celle des cultures photoautotrophes (Bouarab et al., 2004; Liu et al., 2009). De plus, le groupe de Liu et al., est parvenu à démontrer, grâce à des techniques d'analyse du spectre de fluorescence, que l'ajout de glucose, d'acétate ou de glycérol au milieu de culture de *P. tricornutum* provoque une redistribution de l'énergie entre les photosystèmes I et II et une diminution de l'efficacité photochimique du PSII. Cette redistribution est accompagnée d'une réduction du taux de production d'oxygène et du taux de transfert d'électrons, ce qui a permis de conclure à une répression de la photosynthèse chez cette espèce en conditions mixotrophes (Liu et al., 2009).

Les interactions possibles entre les métabolismes d'absorption d'une source de DOC, la respiration cellulaire et la photosynthèse sont donc multiples et une grande variabilité dans la réponse cellulaire est observée dépendamment de l'espèce de microalgue ainsi que de la source de DOC. De plus, la lumière est responsable de la régulation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans ces métabolismes et pour certaines espèces, l'intensité lumineuse régule l'efficacité du métabolisme en mode mixotrophe (Hodaifa et al., 2009). Dans cette optique, il serait intéressant de tester différentes intensités lumineuses afin de déterminer si l'effet bénéfique de la présence de lumière peut également être observé à des densités de biomasse $> 5 \text{ g L}^{-1}$ à l'intérieur de cultures mixotrophes de *S. obliquus*.

Diverses proportions du milieu de culture (BBM) ont été substituées par du perméat de lactosérum afin de déterminer la concentration en sucres permettant une croissance optimale de *S. obliquus*. En effet, des essais effectués avec le glucose ont permis de déterminer qu'à partir d'une certaine concentration (1,5% m/v), un effet négatif peut être observé sur la croissance de cette espèce (Mandal & Mallick, 2009). Les résultats ont permis d'observer une augmentation du taux de croissance des cultures mixotrophes dans un milieu composé jusqu'à 40% v/v de perméat de lactosérum, correspondant approximativement à 40 g de lactose L^{-1} . Au-delà de ces proportions, une augmentation de la durée de la phase de latence précédant la phase de croissance exponentielle était provoquée (résultats non présentés).

Aucune accumulation significative de lipides neutres n'a pu être observée au cours des travaux d'optimisation de la productivité en biomasse des cultures de *S. obliquus* mixotrophes (Chapitre 4). Toutefois, les cultures contrôles photoautotrophes ont accumulé jusqu'à 21,1% de leur biomasse sèche sous la forme de lipides dont 85% étaient des lipides neutres (Tableau 4.3). Quoique cette accumulation puisse être liée à un épuisement des réserves d'azote, ceci n'est vraisemblablement pas le seul facteur puisque cet épuisement s'est également produit à l'intérieur des cultures mixotrophes (Figure 4.3-B). Le suivi du pH effectué au cours de cette expérience a permis de montrer que l'accumulation de lipides neutres observée dans les cultures photoautotrophes était accompagnée d'une importante alcalinisation du milieu de culture ($> 9,5$) contrairement aux cultures mixotrophes dont le pH légèrement acide (6,1) était demeuré relativement stable tout au long de l'expérience. Ainsi, ces observations ont inspiré les travaux d'optimisation présentés au Chapitre 6. Ces travaux ont permis de comparer les effets du mode trophique, du pH, de la densité cellulaire et du temps d'incubation sur l'accumulation de lipides neutres pour trois espèces de microalgues carencées en azote, grâce à une méthode statistique d'optimisation des procédés fréquemment utilisée dans l'industrie : la méthode des surfaces de réponse (Anderson & Whitcomb, 2005; Cheng et al., 2013).

La souche *Chlorella protothecoïdes* UTEX-255 a montré plusieurs caractéristiques intéressantes pour les applications visées par le procédé comparativement aux souches *Scenedesmus obliquus* CPCC-5 et *Ankistrodesmus convolutus* CPCC-309. Notamment, un rendement supérieur lors de la première étape du procédé, qui consistait à la production de biomasse en mode mixotrophe; un contenu en lipides neutres supérieur, tel qu'illustré par une fluorescence rouge de Nile des cellules en moyenne 5 fois supérieure; et la capacité d'accumuler des lipides neutres en l'absence de lumière (hétérotrophie). Ces résultats sont également appuyés par plusieurs articles scientifiques et brevets portant sur cette souche (Heredia-Arroyo et al., 2010; Mohamed et al., 2011; Santos et al., 2011; Xiong et al., 2008).

L'absence d'accumulation lipidique chez *S. obliquus* et *A. convolutus* en conditions hétérotrophes observée dans le cadre de nos travaux suggère que la lumière est un facteur essentiel pour que ce phénomène puisse se produire chez ces souches de microalgues. De plus, le fait qu'une accumulation de lipides ait été observée uniquement à des densités de biomasse

relativement faibles ($< 2,4 \text{ g L}^{-1}$ de masse sèche) en conditions photoautotrophes suggère qu'une dose de lumière minimale doit nécessairement être fournie à chaque cellule pour rendre le phénomène possible. Une analogie peut d'ailleurs être faite avec les mécanismes de la croissance des cultures, alors que la lumière est bien connue comme pouvant être le facteur limitant (Richmond, 2007). La capacité d'accumuler des lipides en mode mixo/hétérotrophe semble donc être spécifique à la souche étudiée.

D'autres essais à l'échelle pilote ont été effectués dans des PBR colonnes de 27 litres. Ces essais ont permis de démontrer qu'un nettoyage exhaustif des systèmes couplé à l'utilisation de la méthode « peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) / catalase » présentée au Chapitre 7 n'était pas suffisant pour assurer l'absence de contamination par d'autres microorganismes dans un milieu de culture composé à 40% v/v de perméat de lactosérum. En effet, d'importantes contaminations ont été observées 24h après l'inoculation de la culture de *S. obliquus* axénique. Ces contaminations pourraient provenir d'une stérilisation incomplète du système, d'erreurs de manipulation lors de l'inoculation ou d'une insuffisance des filtres utilisés dans les systèmes de bullage. Il semble donc qu'une optimisation des systèmes et des procédures d'utilisation soit nécessaire à la réussite de la mise à l'échelle du procédé. Ces travaux pourront s'inspirer des systèmes et procédures déjà existants dans des procédés de fermentation à l'échelle industrielle, telle que la production de bière, de yaourt ou autres.

Pour conclure, le taux d'hydrolyse du lactose relativement lent et constant observé chez les cultures de *S. obliquus* (Figure 7.4) suggère l'absence d'un mécanisme régulateur comparable à celui existant chez *E. coli* pour l'expression des gènes intervenant dans le catabolisme du lactose (opéron *lac*). Il est en effet peu probable que des microorganismes végétaux puissent évoluer pour développer un mécanisme d'utilisation du lactose comparable à celui développé par *Chlorella vulgaris* pour l'utilisation du glucose, en raison de l'absence de ce disaccharide mammifère dans leur milieu naturel. L'enzyme responsable de l'hydrolyse extracellulaire du lactose par cette microalgue pourrait donc avoir une fonction autre telle que la synthèse ou le réarrangement de la paroi. En effet, la paroi cellulaire microalgale est constituée de polysaccharides composés en partie de galactose (Takeda, 1996). Dans le cadre d'un procédé de production de biomasse microalgale à grande échelle, ce taux d'hydrolyse pourrait devenir

problématique s'il s'avérait devenir le facteur limitant la productivité des cultures. De plus la nécessité de fournir une certaine dose de lumière afin de permettre l'accumulation de lipides neutres chez cette espèce est désavantageuse pour une production à grande échelle particulièrement à cause du fait que la phase d'accumulation lipidique devrait pouvoir être induite dans des cultures à haute densité ($> 50 \text{ g L}^{-1}$) afin de faciliter les étapes subséquentes de récolte de la biomasse et d'extraction des lipides. Ces limitations, mises en reliefs grâce aux travaux effectués dans le cadre du présent projet de recherche, devront être abordées à l'aide des méthodes d'ingénierie métabolique et génétique décrites au Chapitre 2. Dans tous les cas, les méthodes du suivi des sucres exposées au Chapitre 5 et exploitées au Chapitre 7 seront d'une grande utilité dans la poursuite des travaux d'optimisation du procédé.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abeliovich, A., Weisman, D. 1978. Role of heterotrophic nutrition in growth of the alga *Scenedesmus obliquus* in high-rate oxidation ponds. *Appl Environ Microbiol*, **35**(1), 32 - 37.
- Abou-Shanab, R.A.I., Hwang, J.-H., Cho, Y., Min, B., Jeon, B.-H. 2011. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. *Applied Energy*, **88**(10), 3300-3306.
- Abreu, A.P., Fernandes, B., Vicente, A.A., Teixeira, J., Dragone, G. 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*, **118**(0), 61-66.
- Agarwal, M., Singh, K., Chaurasia, S.P. 2010. Prediction of biodiesel properties from fatty acid composition using linear regression and ANN techniques. *Indian Chemical Engineer*, **52**(4), 347-361.
- Ahmad, A.L., Yasin, N.H.M., Derek, C.J.C., Lim, J.K. 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **15**(1), 584-593.
- Alberto Vieira Costa, J., Maria Colla, L., Fernando Duarte Filho, P. 2004. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technology*, **92**(3), 237-241.
- Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, **88**(10), 3402-3410.
- Anderson, M.J., Whitcomb, P.J. 2005. *RSM simplified: optimizing processes using Response Surface Methods for design of experiments*. Productivity Press.
- Andrade, M.R., Costa, J.A.V. 2006. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, **264**(1-4), 130-134.
- Angermayr, S.A., Hellingwerf, K.J., Lindblad, P., de Mattos, M.J.T. 2009. Energy biotechnology with cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, **20**(3), 257-263.
- Barrocal, V.M., García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Coca, M. 2010. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. *New Biotechnology*, **27**(6), 851-856.
- Bastien A., Girard JM, Cartier S., Benyagoub M., G., V. 2013. Valorisation industrielle des microalgues : état de la situation en 2013.

- Becker, E. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Becker, E.W. 2007. Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, **25**(2), 207-210.
- Beer, L.L., Boyd, E.S., Peters, J.W., Posewitz, M.C. 2009. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, **20**(3), 264-271.
- Bernard, O. 2010. Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production. *Proceedings of the 9th International Symposium on Dynamics and Control of Process Systems*.
- Bhatnagar, A., Bhatnagar, M., Chinnasamy, S., Das, K.C. 2010. *Chlorella minutissima* - a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **161**(1-8), 523-536.
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., Das, K.C. 2011. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, **88**(10), 3425-3431.
- Biller, P., Friedman, C., Ross, A.B. 2013. Hydrothermal microwave processing of microalgae as a pre-treatment and extraction technique for bio-fuels and bio-products. *Bioresource Technology*, **136**(0), 188-195.
- Bold, H.C., Wynne, M.J. 1985. *Introduction to the algae: structure and reproduction*. Prentice-Hall.
- Bouarab, L., Dauta, A., Loudiki, M. 2004. Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration. *Water Research*, **38**(11), 2706-2712.
- Bougaran, G., Rouxel, C., Dubois, N., Kaas, R., Grouas, S., Lukomska, E., Le Coz, J.-R., Cadoret, J.-P. 2012. Enhancement of neutral lipid productivity in the microalga *Isochrysis affinis Galbana* (T-Iso) by a mutation-selection procedure. *Biotechnology and Bioengineering*, **109**(11), 2737-2745.
- Brennan, L., Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae--A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**(2), 557-577.
- Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H. 2012. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, **124**(0), 217-226.
- Brown, M.R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **145**(1), 79-99.

- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, **151**(1-4), 315-331.
- Brown, M.R., McCausland, M.A., Kowalski, K. 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas spat.* *Aquaculture*, **165**(3-4), 281-293.
- Bumbak, F., Cook, S., Zachleder, V., Hauser, S., Kovar, K. 2011. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **91**(1), 31-46.
- Burkholder, J.M., Glibert, P.M., Skelton, H.M. 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae*, **8**(1), 77-93.
- Cadoret, J.-P., Bernard, O. 2008. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Journal de la Societe de Biologie*, **202**(3), 201-211.
- Cadoret, J.P., Lejeune, A., Michel, R., Carlier, A. 2012. Algenics: providing microalgal technologies for biological drugs. in: *Microalgal biotechnology: potential and production*, (Eds.) C. Posten, C. Walter, De Gruyter pp. 107-109.
- Callebaut, A., Voets, A.M., Motte, J.C. 1990. Anthocyanin production by plant cell cultures on media based on milk whey. *Biotechnology Letters*, **12**(3), 215-218.
- Canada, G.d. 2010. Règlement sur les carburants renouvelables, Vol. DORS2010-189, Ministre de la justice, pp. 81.
- Ceron-Garcia, M.C., Fernandez Sevilla, J.M., Acien-Fernandez, F.G., Molina-Grima, E., Garcia-Amacho, F. 2000. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology*, **12**(3/5), 239-248.
- Ceron Garcia, M.C., Camacho, F.G., Miron, A.S., Sevilla, J.M.F., Chisti, Y., Grima, E.M. 2006. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **16**(5), 689-694.
- Cha, T., Yee, W., Aziz, A. 2012. Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**(4), 1771-1779.
- Cheirsilp, B., Torpee, S. 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, **110**(0), 510-516.
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., Chang, J.-S. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, **102**(1), 71-81.

- Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., Bai, F.-W., Chang, J.-S. 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, **78**(0), 1-10.
- Chen, F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*, **14**(11), 421-426.
- Cheng, K.-C., Ren, M., Ogden, K.L. 2013. Statistical optimization of culture media for growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* UTEX 250. *Bioresource Technology*, **128**(0), 44-48.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**(3), 294-306.
- Chisti, Y., Flickinger, M.C. 2009. Shear Sensitivity. in: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Chisti, Y., Yan, J. 2011. Energy from algae: Current status and future trends: Algal biofuels – A status report. *Applied Energy*, **88**(10), 3277-3279.
- Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F.J. 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of energy and carbon metabolism in the culture on microalgae. *Biotechnology*, **3**(1), 21-34.
- Chojnacka, K., Noworyta, A. 2004. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **34**(5), 461-465.
- Christenson, L., Sims, R. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, **29**(6), 686-702.
- Chu, W.L., Phang, S.M., Goh, S.H. 1995. Influence of Carbon Source on Growth, Biochemical-Composition and Pigmentation of *Ankistrodesmus convolutus*. *Journal of Applied Phycology*, **7**(1), 59-64.
- Combres, C., Laliberte, G., Reyssac, J., de LaNoue, J. 1994a. Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Physiol Plant*, **91**, 729 - 734.
- Combres, C., Laliberte, G., Reyssac, J.S., Delanque, J. 1994b. Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Physiologia Plantarum*, **91**(4), 729-734.
- Cooksey, K.E., Guckert, J.B., Williams, S.A., Callis, P.R. 1987. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *Journal of Microbiological Methods*, **6**(6), 333-345.
- Courchesne, N.M.D., Parisien, A., Wang, B., Lan, C.Q. 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*, **141**(1-2), 31-41.

- da Silva, T.L., Reis, A., Medeiros, R., Oliveira, A.C., Gouveia, L. 2009. Oil production towards biofuel from autotrophic microalgae semicontinuous cultivations monitored by flow cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **159**(2), 568-578.
- Daume, S., Long, B.M., Crouch, P. 2003. Changes in amino acid content of an algal feed species (*Navicula* sp.) and their effect on growth and survival of juvenile abalone (*Haliotis rubra*). *Journal of Applied Phycology*, **15**(2-3), 201-207.
- Davies, C.M., Apte, S.C., Peterson, S.M., Stauber, J.L. 1994. Plant and algal interference in bacterial beta-d-galactosidase and beta-d-glucoronidase assays. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(11), 3959-3964.
- de la Jara, A., Mendoza, H., Martel, A., Molina, C., Nordstron, L., de la Rosa, V., Diaz, R. 2003. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptothecodinium cohnii*. *Journal of Applied Phycology*, **15**(5), 433-438.
- Dean, A.P., Sigee, D.C., Estrada, B., Pittman, J.K. 2010. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, **101**(12), 4499-4507.
- Deng, X.D., Li, Y.J., Fei, X.W. 2009. Microalgae: A promising feedstock for biodiesel. *African Journal of Microbiology Research*, **3**(13), 1008-1014.
- Doan, T.-T., Obbard, J. 2011. Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp. *Journal of Applied Phycology*, **23**(5), 895-901.
- Durmus, N., Tasli, O., Kadioglu, A. 1999. The Effect of Whey on the Growth of some Algae. *Fresenius Envir. Bull.*, **8**, pp. 296-303.
- Dwevedi, A., Kayastha, A. 2010. Plant β -Galactosidases: Physiological Significance and Recent Advances in Technological Applications. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **19**(1), 9-20.
- El-Sheekh, M., Bedaiwy, M., Osman, M., Ismail, M. 2012. Mixotrophic and heterotrophic growth of some microalgae using extract of fungal-treated wheat bran. *International Journal Of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, **1**(1), 12.
- Enzing, C., Nooijen, A., Eggink, G., Springer, J., Wijffels, R.H. 2012. Algae and genetic modification. Research, production and risks.
- Eriksen, N.T. 2008. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, **30**(9), 1525-1536.
- Ethier, S., Woisard, K., Vaughan, D., Wen, Z. 2011. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Bioresource Technology*, **102**(1), 88-93.

- Farooq, W., Lee, Y.-C., Ryu, B.-G., Kim, B.-H., Kim, H.-S., Choi, Y.-E., Yang, J.-W. 2013. Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. *Bioresource Technology*, **132**(0), 230-238.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**(1), 497-509.
- Foley, P.M., Beach, E.S., Zimmerman, J.B. 2011. Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges. *Green Chemistry*, **13**(6), 1399-1405.
- Fortier, M.-O.P., Sturm, B.S.M. 2012. Geographic Analysis of the Feasibility of Collocating Algal Biomass Production with Wastewater Treatment Plants. *Environmental Science & Technology*, **46**(20), 11426-11434.
- Francavilla, M., Colaianna, M., Zotti, M., G. Morgese, M., Trotta, P., Tucci, P., Schiavone, S., Cuomo, V., Trabace, L. 2012. Extraction, Characterization and In Vivo Neuromodulatory Activity of Phytosterols from Microalga *Dunaliella Tertiolecta*. *Current Medicinal Chemistry*, **19**(18), 3058-3067.
- Frank, E., Elgowainy, A., Han, J., Wang, Z. 2013. Life cycle comparison of hydrothermal liquefaction and lipid extraction pathways to renewable diesel from algae. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, **18**(1), 137-158.
- Freyssinet, G., Nigon, V. 1980. Growth of *Euglena gracilis* on Whey. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **9**, 295-303.
- Frick, H., Morley, K. 1995. Metabolism of lactose by *Lemna minor* L. (duckweed) callus. *Process Biochemistry*, **30**(1), 57-62.
- Gao, C., Zhai, Y., Ding, Y., Wu, Q. 2010. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. *Appl Energy*, **87**(3), 756 - 761.
- Garci, M.C.C., Sevilla, J.M.F., Fernandez, F.G.A., Grima, E.M., Camacho, F.G. 2000. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology*, **12**(3-5), 239-248.
- Gardner, R., Peters, P., Peyton, B., Cooksey, K. 2011. Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. *Journal of Applied Phycology*, **23**(6), 1005-1016.
- Gastineau, R., Pouvreau, J.-B., Hellio, C., Morançais, M., Fleurence, J., Gaudin, P., Bourgougnon, N., Mouget, J.-L. 2012. Biological Activities of Purified Marennine, the Blue Pigment Responsible for the Greening of Oysters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**(14), 3599-3605.

- Georgianna, D.R., Mayfield, S.P. 2012. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature*, **488**(7411), 329-335.
- Gerde, J.A., Wang, T., Yao, L., Jung, S., Johnson, L.A., Lamsal, B. 2013. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. *Algal Research*, **2**(2), 145-153.
- Geun Goo, B., Baek, G., Jin Choi, D., Il Park, Y., Synytsya, A., Bleha, R., Ho Seong, D., Lee, C.-G., Kweon Park, J. 2013. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, **129**(0), 343-350.
- Ghasemi Y., R.-A.S., Naseri A. T., Montazeri-Najafabady N., Mobasher M. A. , Dabbagh F. 2012. Microalgae biofuel potentials (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* **48**(2), 126-144.
- Gibson, D.G., Glass, J.I., Lartigue, C., Noskov, V.N., Chuang, R.-Y., Algire, M.A., Benders, G.A., Montague, M.G., Ma, L., Moodie, M.M., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E.A., Young, L., Qi, Z.-Q., Segall-Shapiro, T.H., Calvey, C.H., Parmar, P.P., Hutchison, C.A., Smith, H.O., Venter, J.C. 2010. Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. *Science*, **329**(5987), 52-56.
- Gimpel, J.A., Specht, E.A., Georgianna, D.R., Mayfield, S.P. 2013. Advances in microalgae engineering and synthetic biology applications for biofuel production. *Current Opinion in Chemical Biology*, **17**(3), 489-495.
- Girard, J.-M., Deschênes, J.-S., Tremblay, R., Gagnon, J. 2013. FT-IR/ATR univariate and multivariate calibration models for in situ monitoring of sugars in complex microalgal culture media. *Bioresource Technology*, **144**(0), 664-668.
- Girard, J.M., Roy, M.L., Ben Hafsa, M., Gagnon, J., Heitz, M., Faucheux, N., Tremblay, R., Deschênes, J.S. 2014. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research* **5**(0), 241-248.
- Glencross, B.D. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, **1**(2), 71-124.
- Goksan, T., Ak, I., Gokpinar, S. 2010. An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **20**(9), 1276-1282.
- Gong, Y.M., Jiang, M.L. 2011. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnology Letters*, **33**(7), 1269-1284.
- Gouveia, L., Oliveira, A.C. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **36**(2), 269-274.

- Greenwell, H.C., Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J. 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*, **7**(46), 703-726.
- Griffiths, M., Harrison, S. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, **21**(5), 493-507.
- Griffiths, M., Hille, R., Harrison, S.L. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*, **24**(5), 989-1001.
- Griffiths, M.J., Garcin, C., van Hille, R.P., Harrison, S.T.L. 2011. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, **85**(2), 119-123.
- Guihéneuf, F., Mimouni, V., Ulmann, L., Tremblin, G. 2009. Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **369**(2), 136-143.
- Guo, S.-L., Zhao, X.-Q., Tang, Y., Wan, C., Alam, M.A., Ho, S.-H., Bai, F.-W., Chang, J.-S. 2013. Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Biotechnology*, **163**(1), 61-68.
- Gupta, R., Bhadauriya, P., Chauhan, V.S., Bisen, P.S. 2008. Impact of UV-B radiation on thylakoid membrane and fatty acid profile of *Spirulina platensis*. *Current Microbiology*, **56**(2), 156-161.
- Habib, M.A.B., Yusqff, F.M., Prang, S.M., Mohamed, S., Kamarudin, M.S. 2004. Growth and Nutritional Value of a Tropical Green Alga, *Ankistrodesmus convolutus* Corda, in Agro-industrial Effluents. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, **27**(2), 79-89.
- Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A. 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, **30**(3), 709-732.
- Hallmann, A., Sumper, M. 1996. The *Chlorella* hexose/H⁺ symporter is a useful selectable marker and biochemical reagent when expressed in *Volvox*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, pp. 669-673.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G., Danquah, M. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14** 1037-1047.
- Hempel, N., Petrick, I., Behrendt, F. 2012. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, **24**(6), 1407-1418.

- Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Hu, B. 2010. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **162**(7), 1978-1995.
- Héroutart, D., Sangwan, R.S., Sangwan-Norreel, B.S. 1991. Selection and characteristics of a lactose-adapted *Datura innoxia* cell line grown in suspension culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **24**(2), 97-104.
- Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Chang, J.-S. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, **113**(0), 244-252.
- Hodaifa, G., Martínez, M.E., Sánchez, S. 2009. Daily doses of light in relation to the growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted three-phase olive mill wastewater. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **84**(10), 1550-1558.
- Hodaifa, G., Sánchez, S., Martínez, M.E., Órpez, R. 2013. Biomass production of *Scenedesmus obliquus* from mixtures of urban and olive-oil mill wastewaters used as culture medium. *Applied Energy*, **104**(0), 345-352.
- Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Erata, M., Higashihara, T. 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean. *Mycological Research*, **102**(4), 439-448.
- Horst, I., Parker, B.M., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott, S.A., Smith, A.G. 2012. Treatment of *Phaeodactylum tricornutum* cells with papain facilitates lipid extraction. *Journal of Biotechnology*, **162**(1), 40-49.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, **54**(4), 621-639.
- Huber, G.W., Corma, A. 2007. Synergies between Bio- and Oil Refineries for the Production of Fuels from Biomass. *Angewandte Chemie International Edition*, **46**(38), 7184-7201.
- Huntley, M.E., Redalje, D.G. 2006. CO₂ Mitigation and Renewable Oil from Photosynthetic Microbes : A New Appraisal *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*.
- Huss, V., Ciniglia, C., Cennamo, P., Cozzolino, S., Pinto, G., Pollio, A. 2002. Phylogenetic relationships and taxonomic position of *Chlorella* -like isolates from low pH environments (pH < 3.0). *BMC Evolutionary Biology*, **2**(1), 1-9.
- Ibañez, E., Cifuentes, A. 2013. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93**(4), 703-709.
- IEA, I.E.A. 2011. Technology Roadmap, Biofuels for Transport. pp. 56.

- Illman, A.M., Scragg, A.H., Shales, S.W. 2000. Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**(8), 631-635.
- Iskandarov, U., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. 2011. Selection of a DGLA-producing mutant of the microalga *Parietochloris incisa*: I. Identification of mutation site and expression of VLC-PUFA biosynthesis genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **90**(1), 249-256.
- Jacob, F., Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, **3**(3), 318-356.
- Jäpelt, R.B., Jakobsen, J. 2013. Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis and biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, **4**.
- Johnson, M.B., Wen, Z.Y. 2009. Production of Biodiesel Fuel from the Microalga *Schizochytrium limacinum* by Direct Transesterification of Algal Biomass. *Energy & Fuels*, **23**, 5179-5183.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embiruçu, M., Ghirardi, M.L. 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, **101**(4), 1406-1413.
- Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. 2011. Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification. *Biochimie*, **93**(1), 91-100.
- Khozin-Goldberg, I., Iskandarov, U., Cohen, Z. 2011. LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **91**(4), 905-915.
- Kindle, K.L. 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**(3), 1228-1232.
- Kirchmayr, A., Griesbeck, C. 2012. Genetic engineering, methods and targets. in: *Microalgal biotechnology: potential and production*, (Eds.) C. Posten, C. Walter, De Gruyter, pp. 87-105.
- Kirk, J.T.O. (1994). *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. 2nd ed. Cambridge University Press.
- Klok, A.J., Martens, D.E., Wijffels, R.H., Lamers, P.P. 2013. Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae. *Bioresource Technology*, **134**(0), 233-243.
- Lalucat, J., Imperial, J., Parés, R. 1984. Utilization of light for the assimilation of organic matter in Chlorella sp. VJ79. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**(7), 677-681.
- Lam, M.K., Lee, K.T. 2012. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, **30**(3), 673-690.

- Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., Feussner, I. 2011. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology*, **11**(1), 124.
- Lardon, L., Helias, A., Sialve, B., Stayer, J.P., Bernard, O. 2009. Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. *Environmental Science & Technology*, **43**(17), 6475-6481.
- Lauersen, K.J., Berger, H., Mussnug, J.H., Kruse, O. 2013. Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, **167**(2), 101-110.
- Lee, A.K., Lewis, D.M., Ashman, P.J. 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy*, **46**(0), 89-101.
- Lee, Y.-K. 2004a. Algal Nutrition – Heterotrophic Carbon Nutrition. in: *Handbook of Microalgal Culture*, Blackwell Publishing Ltd, pp. 116-124.
- Lee, Y.-K. 2004b. Algal Nutrition: Heterotrophic Carbon Nutrition. in: *Handbook of Microalgal Culture*, Blackwell Publishing Ltd, pp. 116-124.
- Lee, Y.-K. 2001. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, **13**(4), 307-315.
- Lepage, G., Roy, C.C. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, **25**(12), 1391-6.
- Leupold, M., Hindersin, S., Gust, G., Kerner, M., Hanelt, D. 2012. Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, 1-11.
- Levine, R.B., Pinnarat, T., Savage, P.E. 2010. Biodiesel Production from Wet Algal Biomass through in Situ Lipid Hydrolysis and Supercritical Transesterification. *Energy & Fuels*, **24**, 5235-5243.
- Li, Q., Du, W., Liu, D.H. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **80**(5), 749-756.
- Li, X., Hu, H.Y., Gan, K., Sun, Y.X. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, **101**(14), 5494-5500.
- Li, X., Hu, H.Y., Zhang, Y.P. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, **102**(3), 3098-3102.

- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., Yesuf, J., Trushenski, J., Blackburn, J.W. 2010. Use of sweet sorghum juice for lipid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Bioresource Technology*, **101**(10), 3623-3627.
- Liang, Y.N., Sarkany, N., Cui, Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, **31**(7), 1043-1049.
- Lin, Q.A., Lin, J.D. 2011. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresource Technology*, **102**(2), 1615-1621.
- Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cai, Z., Hu, Z. 2009. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*, **21**(2), 239-246.
- Liu, Z.Y., Wang, G.C., Zhou, B.C. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, **99**, 4717-4722.
- Lohr, M., Schwender, J., Polle, J.E.W. 2012. Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: A spotlight on algae. *Plant Science*, **185–186**(0), 9-22.
- Lück, H. 1966. L'emploi de l'eau oxygénée dans le lait et les produits laitiers. in: *Hygiène du lait. Mesures à prendre aux stades de la production, du traitement et de la distribution*, (Ed.) O.m.d.l. santé, Vol. Monographie No 48, Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture et Organisation mondiale de la Santé. Genève, Suisse, pp. 805.
- Luo, J., Ding, L., Qi, B., Jaffrin, M.Y., Wan, Y. 2011. A two-stage ultrafiltration and nanofiltration process for recycling dairy wastewater. *Bioresource Technology*, **102**(16), 7437-7442.
- Malcata, F.X. 2011. Microalgae and biofuels: A promising partnership? *Trends in Biotechnology*, **29**(11), 542-549.
- Mallick, N., Mohn, F.H., Soeder, C.J., Grobbelaar, J.U. 2002. Ameliorative role of nitric oxide on H₂O₂ toxicity to a chlorophycean alga *Scenedesmus obliquus*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **48**(1), 1-7.
- Mandal, S., Mallick, N. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **84**(2), 281-291.
- Mandal, S., Mallick, N. 2011. Waste utilization and biodiesel production by the green microalga *Scenedesmus obliquus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(1), 374-377.
- Marchetti, J., Bougaran, G., Le Dean, L., Mégrier, C., Lukomska, E., Kaas, R., Olivo, E., Baron, R., Robert, R., Cadoret, J.P. 2012. Optimizing conditions for the continuous

- culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture*, **326–329**(0), 106-115.
- Martinez, F., Orus, M.I. 1991. Interactions between Glucose and Inorganic Carbon Metabolism in *Chlorella vulgaris* Strain UAM 101. *Plant Physiol.*, **95**, 1150-1155.
- Martinez, J.L. 2007. *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*. Taylor & Francis.
- Martínez, M.E., Camacho, F., Jiménez, J.M., Espínola, J.B. 1997. Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of *Chlorella pyrenoidosa* mixotrophic growth. *Process Biochemistry*, **32**(2), 93-98.
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J.F. 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **163**(2), 221-234.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **14**(1), 217-232.
- Mayers, J.J., Flynn, K.J., Shields, R.J. 2013. Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Bioresource Technology*, **148**(0), 215-220.
- Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P., Palavra, A.F. 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*, **356**(0), 328-334.
- Mercer, P., Armenta, R.E. 2011. Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **113**(5), 539-547.
- Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., Mathieu, M., Picot, L., Bougaran, G., Cadoret, J.-P., Morant-Manceau, A., Schoefs, B. 2012. The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **13**(15), 2733-2750.
- Mitra, D., van Leeuwen, J., Lamsal, B. 2012. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, **1**(1), 40-48.
- Moellering, E., Benning, C. 2010. RNA Interference Silencing of a Major Lipid Droplet Protein Affects Lipid Droplet Size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, **9**(1), 97-106.
- Mohamed, M.S., Wei, L.Z., Ariff, A.B. 2011. Heterotrophic Cultivation of Microalgae for Production of Biodiesel. *Recent Patents on Biotechnology*, **5**(2), 95-107.

- Molina Grima, E., Belarbi, E.H., Acién Fernández, F.G., Robles Medina, A., Chisti, Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, **20**(7–8), 491-515.
- Mørup, A.J., Christensen, P.R., Aarup, D.F., Dithmer, L., Mamakhel, A., Glasius, M., Iversen, B.B. 2012. Hydrothermal Liquefaction of Dried Distillers Grains with Solubles: A Reaction Temperature Study. *Energy & Fuels*, **26**(9), 5944-5953.
- Myers, D. 1999. *Surfaces, interfaces, and colloids: principles and applications*. Wiley-VCH.
- Nie, C., Liu, B., Zhang, Y., Zhao, G., Fan, X., Ning, X., Zhang, W. 2013. Production and secretion of *Lactobacillus crispatus* β -galactosidase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, **92**(1), 88-93.
- Norsker, N.H., Barbosa, M.J., Vermue, M.H., Wijffels, R.H. 2011. Microalgal production - A close look at the economics. *Biotechnology Advances*, **29**(1), 24-27.
- O'Neill, B.M., Mikkelsen, K.L., Gutierrez, N.M., Cunningham, J.L., Wolff, K.L., Szyjka, S.J., Yohn, C.B., Redding, K.E., Mendez, M.J. 2012. An exogenous chloroplast genome for complex sequence manipulation in algae. *Nucleic Acids Research*, **40**(6), 2782-2792.
- Ogawa, T., Aiba, S. 1981. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and Bioengineering*, **23**(5), 1121-1132.
- Ogbonna, J., Ichige, E., Tanaka, H. 2002. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58**(4), 532-538.
- Oh, S.H., Han, J.G., Kim, Y., Ha, J.H., Kim, S.S., Jeong, M.H., Jeong, H.S., Kim, N.Y., Cho, J.S., Yoon, W.B., Lee, S.Y., Kang, D.H., Lee, H.Y. 2009. Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **108**(5), 429-434.
- Orús, M.I., Marco, E., Martínez, F. 1991. Suitability of *Chlorella vulgaris* UAM 101 for heterotrophic biomass production. *Bioresource Technology*, **38**(2-3), 179-184.
- Pan, Y., Subba Rao, D.V., K.H., M., Pocklington, R. 1996. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. I. Batch culture studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **131**, 225-233.
- Park, K., Whitney, C., McNichol, J., Dickinson, K., MacQuarrie, S., Skrupski, B., Zou, J., Wilson, K., O'Leary, S.B., McGinn, P. 2012. Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: potential applications for wastewater remediation for biofuel production. *Journal of Applied Phycology*, **24**(3), 339-348.

- Parrish, C. 1999. Determination of Total Lipid, Lipid Classes, and Fatty Acids in Aquatic Samples. in: *Lipids in Freshwater Ecosystems*, (Eds.) M. Arts, B. Wainman, Springer New York, pp. 4-20.
- Pereira, H., Barreira, L., Mozes, A., Florindo, C., Polo, C., Duarte, C., Custodio, L., Varela, J. 2011. Microplate-based high throughput screening procedure for the isolation of lipid-rich marine microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, **4**(1), 61.
- Perez-Garcia, O., Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Bashan, Y. 2010. Efficiency of Growth and Nutrient Uptake from Wastewater by Heterotrophic, Autotrophic, and Mixotrophic Cultivation of *Chlorella Vulgaris* Immobilized with *Azospirillum Brasilense*. *Journal of Phycology*, **46**(4), 800-812.
- Perez-Garcia, O., Bashan, Y., Esther Puente, M. 2011a. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*, **47**(1), 190-199.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F., de-Bashan, L., Bashan, Y. 2011b. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res*, **45**, 11 - 36.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2011c. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *water research* **45** 11-36.
- Peterson, C.L., Feldman, M., Korus, R., Auld, D.L. 1991. Batch type transesterification process for winter rape oil. *Applied engineering in agriculture*, **7**(6), 711-716.
- Plana, N., Nicolle, C., Ferre, R., Camps, J., Cos, R., Villoria, J., Masana, L. 2008. Plant sterol-enriched fermented milk enhances the attainment of LDL-cholesterol goal in hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Nutrition*, **47**(1), 32-39.
- Prajapati, S.K., Kaushik, P., Malik, A., Vijay, V.K. 2013. Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges. *Biotechnology Advances*, **31**(8), 1408-1425.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J. 2012. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, **110**(0), 48-68.
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., Legrand, J. 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*, **100**(23), 5988-5995.
- Pyle, D. 2008. Use of biodiesel-derived crude glycerol for the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids by the microalga *Schizochytrium limacinum*. in: *Virginia Polytechnic Institute and State University*, Vol. 83 p., Virginia Polytechnic Institute and State University.

- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Fuerstenberg, S.I., Tae, H., Settlege, R.E., Boore, J.L., Posewitz, M.C. 2012. Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nat Commun*, **3**, 686.
- Ramos, M.J., Fernandez, C.M., Casas, A., Rodriguez, L., Perez, A. 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, **100**(1), 261-268.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, **88**(10), 3411-3424.
- Ren, H.-Y., Liu, B.-F., Ma, C., Zhao, L., Ren, N.-Q. 2013. A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. Strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. *Biotechnology for Biofuels*, **6**(143).
- Richmond, A. 2007. Biological Principles of Mass Cultivation. in: *Handbook of Microalgal Culture*, Blackwell Publishing Ltd, pp. 125-177.
- Richmond, A. 2008. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Wiley.
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. 2009. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **102**(1), 100-112.
- Salama, E.-S., Kim, H.-C., Abou-Shanab, R.I., Ji, M.-K., Oh, Y.-K., Kim, S.-H., Jeon, B.-H. 2013. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **36**(6), 827-833.
- Samarakoon, K., Jeon, Y.-J. 2012. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae — A review. *Food Research International*, **48**(2), 948-960.
- Samejima, H., Myers, J. 1958. On the heterotrophic growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of General Microbiology*, **18**(1), 107-17.
- Sander, K., Murthy, G.S. 2010. Life cycle analysis of algae biodiesel. *International Journal of Life Cycle Assessment*, **15**(7), 704-714.
- Santos, C., Ferreira, M., Lopes da Silva, T., Gouveia, L., Novais, J., Reis, A. 2011. A symbiotic gas exchange between bioreactors enhances microalgal biomass and lipid productivities: taking advantage of complementary nutritional modes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **38**(8), 909-917.

- Sari, Y.W., Bruins, M.E., Sanders, J.P.M. 2013. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. *Industrial Crops and Products*, **43**(0), 78-83.
- Satyanarayana, K.G., Mariano, A.B., Vargas, J.V.C. 2011. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*, **35**(4), 291-311.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenergy Research*, **1**(1), 20-43.
- Serra, T., Zilberman, D. 2013. Biofuel-related price transmission literature: A review. *Energy Economics*, **37**(0), 141-151.
- Shamala, T.R., Drawert, F., Leupold, G. 1982. Studies on *Scenedesmus acutus* growth. I effect of autotrophic and mixotrophic conditions on the growth of *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and Bioengineering*, **24**(6), 1287-1299.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P. 1998. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. *NREL, Close-Out Report, TP-580-24190*, 328.
- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z., Mao, E. 2010. Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **160**(6), 1674-1684.
- Shifrin, N.S., Chisholm, S.W. 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycle. *Journal of Phycology*, **17**(4), 374-384.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, **27**(4), 409-416.
- Silva, A., Guimares, P.M.R., Teixeira, J.A., Domingues, L. 2010. Fermentation of deproteinized cheese whey powder solutions to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: effect of supplementation with corn steep liquor and repeated-batch operation with biomass recycling by flocculation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **37**(9), 973-982.
- Singh, J., Gu, S. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**(9), 2596-2610.
- Smithers, G.W. 2008. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*, **18**(7), 695-704.
- Solak, B.B., Akin, N. 2012. Health benefits of whey protein: a review. *Journal of food science and engineering*, **2**, 129-137.

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101**(2), 87-96.
- Stadler, R., Wolf, K., Hilgarth, C., Tanner, W., Sauer, N. 1995. Subcellular localization of the inducible chlorella HUP1 monosaccharide-H⁺ symporter and cloning of a co-induced galactose-H⁺ symporter. *Plant Physiology*, **107**(1), 33-41.
- Stansell, G., Gray, V., Sym, S. 2012. Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *Journal of Applied Phycology*, **24**(4), 791-801.
- Stein, J. 1973. *Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2010. *Plants physiology*. Sinauer Associates, Incorporated.
- Takeda, H. 1996. Cell wall sugars of some Scenedesmus species. *Phytochemistry*, **42**(3), 673-675.
- Tan, Y., Lin, J. 2011. Biomass production and fatty acid profile of a Scenedesmus rubescens-like microalga. *Bioresource Technology*, **102**(21), 10131-10135.
- Tardy-Laporte, C., Arnold, A.A., Genard, B., Gastineau, R., Morancais, M., Mouget, J.-L., Tremblay, R., Marcotte, I. 2013. A 2H solid-state NMR study of the effect of antimicrobial agents on intact *Escherichia coli* without mutating. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1828**(2), 614-622.
- Theriault, R.J. 1965. Heterotrophic Growth and Production of Xanthophylls by *Chlorella pyrenoidosa*. *Applied Microbiology*, **13**(3), pp. 402-416.
- Tremblay, G., Belzile, C., Gosselin, M., Poulin, M., Roy, S., Tremblay, J. 2009. Late summer phytoplankton distribution along a 3500 km transect in Canadian Arctic waters: strong numerical dominance by picoeukaryotes. *Aquatic Microbial Ecology*, **54**(1), 55-70.
- Ulrich, K.T., Eppinger, S.D. 2007. *Product Design and Development*,. 4th ed. McGraw-Hill.
- Um, B.-H., Kim, Y.-S. 2009. Review: A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **15**(1), 1-7.
- Varfolomeev, S., Wasserman, L. 2011. Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **47**(9), 789-807.
- Verma, N.M., Mehrotra, S., Shukla, A., Mishra, B.N. 2010. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *African Journal of Biotechnology*, **9**(10), 1402-1411.
- Vo, T.-S., Ryu, B., Kim, S.-K. 2013. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. *Journal of Functional Foods*, **5**(3), 1336-1346.

- Wan, M., Liu, P., Xia, J., Rosenberg, J., Oyler, G., Betenbaugh, M., Nie, Z., Qiu, G. 2011. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **91**(3), 835-844.
- Wang, Y., Peng, J. 2008 Growth-associated biosynthesis of astaxanthin in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *World J Microbiol Biotechnol* **24**, pp. 1915–1922.
- Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kocielek, P., Thorp, J.H. 2002. *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Elsevier Science.
- Wei, W.Z., Fu, L.X., Chen, G. 2011. Multivariate Analysis of Amino Acid Composition of 7 Types of Chlorella. *Food Science*, **32**(5), 254-257.
- Wen, F., Celoy, R., Price, I., Ebolo, J.J., Hawes, M.C. 2008. Identification and characterization of a rhizosphere β -galactosidase from *Pisum sativum* L. *Plant and Soil*, **304**(1-2), 133-144.
- Wijffels, R.H., Barbosa, M.J. 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science*, **329**(5993), 796-799.
- Will, A., Graßl, R., Erdmenger, J., Caspari, T., Tanner, W. 1998. Alteration of substrate affinities and specificities of the chlorella hexose/H⁺ symporters by mutations and construction of chimeras. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(19), 11456-11462.
- Williams, P.J.I.B., Laurens, L.M.L. 2010. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, **3**(5), 554-590.
- Wiltshire, K.H., Boersma, M., Ouml, Iler, A., Buhtz, H. 2000. Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Aquatic Ecology*, **34**(2), 119-126.
- Xie, T., Sun, Y., Du, K., Liang, B., Cheng, R., Zhang, Y. 2012. Optimization of heterotrophic cultivation of *Chlorella* sp. for oil production. *Bioresource Technology*, **118**(0), 235-242.
- Xiong, W., Li, X.F., Xiang, J.Y., Wu, Q.Y. 2008. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **78**(1), 29-36.
- Xu, H., Miao, X.L., Wu, Q.Y. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, **126**(4), 499-507.

- Xu, L., Brilman, D.W.F., Withag, J.A.M., Brem, G., Kersten, S. 2011. Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: Energy balance analysis. *Bioresource Technology*, **102**(8), 5113-5122.
- Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K. 2000 Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, **6** 87–102.
- Yen, H.-W., Chiang, W.-C. 2012. Effects of mutual shading, pressurization and oxygen partial pressure on the autotrophical cultivation of *Scenedesmus obliquus*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **43**(6), 820-824.
- Yen, H.-W., Hu, I.C., Chen, C.-Y., Ho, S.-H., Lee, D.-J., Chang, J.-S. 2013. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. *Bioresource Technology*, **135**(0), 166-174.
- Yi-Xin, H., Kwang Myung, C., Lafontaine Rivera, J.G., Monte, E., Shen, C.R., Yajun, Y., Liao, J.C. 2011. Conversion of proteins into biofuels by engineering nitrogen flux. *Nature Biotechnology*, **29**(4), 346-351.
- Zaslavskaja, L.A., Lippmeier, J.C., Kroth, P.G., Grossman, A.R., Apt, K.E. 2000. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. *Journal of Phycology*, **36**(2), 379-386.
- Zhao, G., Chen, X., Wang, L., Zhou, S., Feng, H., Chen, W.N., Lau, R. 2013. Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation. *Bioresource Technology*, **128**(0), 337-344.
- Zhou, X., Xia, L., Ge, H., Zhang, D., Hu, C. 2013. Feasibility of biodiesel production by microalgae *Chlorella* sp. (FACHB-1748) under outdoor conditions. *Bioresource Technology*, **138**(0), 131-135.
- Zittelli, G.C., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M.R. 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, **261**(3), 932-943.

ANNEXE A

List of >100 microalgae species with potential for biodiesel production and citation in recent literature.

Phyllum	Class	Specie	Citations (review)
Cyanophyta	Cyanophyceae	<i>Anabaena</i> sp.	(Brennan & Owende, 2010)
		<i>Anabaena cylindrical</i>	(Ghasemi Y., 2012; Griffiths & Harrison, 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Verma et al., 2010)
		<i>Arthrospira</i> sp.	(Brennan & Owende, 2010; Greenwell et al., 2010)
		<i>Arthrospira platensis</i>	(Brennan & Owende, 2010; Gong & Jiang, 2011)
		<i>Microcystis</i> sp.	(Lam & Lee, 2012)
		<i>Microcystis aeruginosa</i>	(Brennan & Owende, 2010)
		<i>Oscillatoria</i> sp.	(Griffiths & Harrison, 2009)
		<i>Spirulina</i> sp.	(Brennan & Owende, 2010)
		<i>Spirulina maxima</i>	(Chen et al., 2011; Gouveia & Oliveira, 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Halim et al., 2012; Hempel et al., 2012; Mata et al., 2010; Satyanarayana et al., 2011; Sialve et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Verma et al., 2010)
		<i>Spirulina platensis</i>	(Amaro et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Ghasemi Y., 2012; Gong & Jiang, 2011; Griffiths & Harrison, 2009; Halim et al., 2012; Hempel et al., 2012; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Sialve et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
		<i>Synechococcus</i> sp.	(Courchesne et al., 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009)

Rhodophyta	Rhodophyceae	<i>Synechocystis</i> sp.	(Angermayr et al., 2009)
		<i>Galdieria sulphuraria</i>	(Brennan & Owende, 2010)
		<i>Porphyridium cruentum</i>	(Ahmad et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Griffiths & Harrison, 2009; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
	Florideophyceae	<i>Hypnea charoides</i>	(Halim et al., 2012)
Chlorophyta	Cyanidiophyceae	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	(Courchesne et al., 2009)
	Chlorophyceae	<i>Ankistrodesmus</i> sp.	(Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Mata et al., 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
		<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	(Griffiths & Harrison, 2009)
		<i>Botryococcus</i> sp.	(Amaro et al., 2011; Lam & Lee, 2012; Malcata, 2011)
		<i>Botryococcus braunii</i>	(Amaro et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Chisti, 2007; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Halim et al., 2012; Huntley & Redalje, 2006; Lam & Lee, 2012; Mata et al., 2010; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
		<i>Chlamydomonas</i> sp.	(Ghasemi Y., 2012; Verma et al., 2010)
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	(Beer et al., 2009; Courchesne et al., 2009; Deng et al., 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Lam & Lee, 2012; Satyanarayana et al., 2011; Sialve et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009)
		<i>Chlamydomonas applanata</i>	(Griffiths & Harrison, 2009)
		<i>Chlorococcum</i> sp.	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Brennan & Owende,

	2010; Chen et al., 2011; Gong & Jiang, 2011; Halim et al., 2012; Lam & Lee, 2012; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	(Hempel et al., 2012)
<i>Choricystis minor</i>	(Lam & Lee, 2012)
<i>Dunaliella sp.</i>	(Amaro et al., 2011; Courchesne et al., 2009; Deng et al., 2009; Lam & Lee, 2012; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
<i>Dunaliella bioculata</i>	(Gouveia & Oliveira, 2009; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Verma et al., 2010)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	(Amaro et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Griffiths & Harrison, 2009; Lam & Lee, 2012; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
<i>Dunaliella salina</i>	(Amaro et al., 2011; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Gong & Jiang, 2011; Gouveia & Oliveira, 2009; Greenwell et al., 2010; Griffiths & Harrison, 2009; Huntley & Redalje, 2006; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Satyanarayana et al., 2011; Sialve et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
<i>Dunaliella primolecta</i>	(Amaro et al., 2011; Chisti, 2007; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Griffiths & Harrison, 2009; Huntley &

	Redalje, 2006; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
<i>Haematococcus pluviialis</i>	(Amaro et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Gong & Jiang, 2011; Greenwell et al., 2010; Huntley & Redalje, 2006; Lam & Lee, 2012; Malcata, 2011; Mata et al., 2010)
<i>Nannochloris</i> sp.	(Amaro et al., 2011; Chen et al., 2011; Chisti, 2007; Courchesne et al., 2009; Deng et al., 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
<i>Neochloris</i> sp.	(Hempel et al., 2012)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	(Amaro et al., 2011; Chen et al., 2011; Chisti, 2007; Courchesne et al., 2009; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Gong & Jiang, 2011; Gouveia & Oliveira, 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Lam & Lee, 2012; Li et al., 2008; Malcata, 2011; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Verma et al., 2010)
<i>Ourococcus</i> sp.	(Griffiths & Harrison, 2009)
<i>Parietochloris incisa</i>	(Li et al., 2008; Satyanarayana et al., 2011)
<i>Pediastrum boryanum</i>	(Hempel et al., 2012)
<i>Scenedesmus</i> sp.	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Gong & Jiang, 2011; Lam & Lee, 2012; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Singh & Gu, 2010)

<i>Scenedesmus acutus</i>	(Amaro et al., 2011; Mata et al., 2010)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	(Amaro et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Deng et al., 2009; Gong & Jiang, 2011; Gouveia & Oliveira, 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Satyanarayana et al., 2011; Sialve et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	(Deng et al., 2009; Gouveia & Oliveira, 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Lam & Lee, 2012; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Verma et al., 2010)
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Chen et al., 2011; Griffiths & Harrison, 2009; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
<i>Scenedesmus rubescens</i>	(Hempel et al., 2012)
<i>Selenastrum</i> sp.	(Ghasemi Y., 2012; Verma et al., 2010)
<i>Selenastrum gracile</i>	(Griffiths & Harrison, 2009)
<i>Tetraselmis</i> sp.	(Ahmad et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Sialve et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
<i>Tetraselmis suecica</i> ,	(Ahmad et al., 2011; Chen et al., 2011; Chisti, 2007; Ghasemi Y., 2012; Gong & Jiang, 2011; Griffiths & Harrison, 2009;

		Huntley & Redalje, 2006; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Verma et al., 2010)
	<i>Tetraselmis maculata</i>	(Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Verma et al., 2010)
	<i>Volvox carteri</i>	(Beer et al., 2009; Courchesne et al., 2009)
Trebouxiophyceae	<i>Chlorella</i> sp.	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Chisti, 2007; Deng et al., 2009; Gong & Jiang, 2011; Greenwell et al., 2010; Halim et al., 2012; Hempel et al., 2012; Lam & Lee, 2012; Li et al., 2008; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Courchesne et al., 2009; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Gouveia & Oliveira, 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Halim et al., 2012; Hempel et al., 2012; Huntley & Redalje, 2006; Lam & Lee, 2012; Li et al., 2008; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Satyanarayana et al., 2011; Sialve et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
	<i>Chlorella emersonii</i>	(Amaro et al., 2011; Chen et al., 2011; Courchesne et al., 2009; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Gouveia & Oliveira, 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Huntley & Redalje, 2006;

	Li et al., 2008; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Satyanarayana et al., 2011; Sialve et al., 2009; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
<i>Chlorella fusca</i>	(Hempel et al., 2012)
<i>Chlorella minutissima</i>	(Chen et al., 2011; Courchesne et al., 2009; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Gouveia & Oliveira, 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Hempel et al., 2012; Huntley & Redalje, 2006; Li et al., 2008; Satyanarayana et al., 2011; Verma et al., 2010)
<i>Chlorella protothecoides</i>	(Amaro et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Gong & Jiang, 2011; Gouveia & Oliveira, 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Lam & Lee, 2012; Li et al., 2008; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Satyanarayana et al., 2011; Sialve et al., 2009; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	(Amaro et al., 2011; Courchesne et al., 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Lam & Lee, 2012; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Sialve et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
<i>Chlorella saccharophila</i>	(Hempel et al., 2012)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Gong & Jiang, 2011; Gouveia & Oliveira, 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Li et al., 2008; Malcata, 2011; Mata et al.,

			2010; Rodolfi et al., 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010) (Brennan & Owende, 2010)
		<i>Chlorella kessleri</i>	
		<i>Chlorella zofingiensis</i>	(Hempel et al., 2012)
		<i>Oocystis pusilla</i>	(Mata et al., 2010)
		<i>Stichococcus</i> sp.	(Ghasemi Y., 2012; Verma et al., 2010)
	Prasinophyceae	<i>Ostreococcus tauri</i>	(Courchesne et al., 2009)
	Zygnematophyceae	<i>Cosmarium</i> sp.	(Hempel et al., 2012)
		<i>Spirogyra</i> sp.	(Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009)
Euglenophyta	Euglenophyceae	<i>Euglena gracilis</i>	(Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Griffiths & Harrison, 2009; Mata et al., 2010; Sialve et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
Dinophyta	Dinophyceae	<i>Cryptothecodinium cohnii</i>	(Brennan & Owende, 2010; Chisti, 2007; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Griffiths & Harrison, 2009; Mata et al., 2010; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
Heterokonta	Bacillariophyceae	<i>Amphiprora hyalina</i>	(Griffiths & Harrison, 2009)
		<i>Amphora</i> sp.	(Griffiths & Harrison, 2009)
		<i>Chaetoceros calcitrans</i>	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Chen et al., 2011; Griffiths & Harrison, 2009; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
		<i>Chaetoceros muelleri</i>	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Chen et al., 2011; Deng et al., 2009; Ghasemi Y.,

	2012; Griffiths & Harrison, 2009; Halim et al., 2012; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
<i>Cyclotella</i> sp.	(Ghasemi Y., 2012)
<i>Cyclotella</i>	(Courchesne et al., 2009;
<i>cryptica</i>	Griffiths & Harrison, 2009)
<i>Cylindrotheca</i>	(Chisti, 2007; Griffiths &
sp.	Harrison, 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010)
<i>Hantzschia</i> sp.	(Ghasemi Y., 2012; Verma et al., 2010)
<i>Monoraphidium</i>	(Griffiths & Harrison, 2009;
<i>minutum</i>	Halim et al., 2012)
<i>Navicula</i>	(Griffiths & Harrison, 2009)
<i>acceptata</i>	
<i>Navicula</i>	(Griffiths & Harrison, 2009)
<i>pelliculosa</i>	
<i>Navicula</i>	(Courchesne et al., 2009;
<i>saprophila</i> .	Griffiths & Harrison, 2009)
<i>Nitzschia</i> sp.	(Chisti, 2007; Mata et al., 2010; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
<i>Nitzschia</i>	(Ghasemi Y., 2012; Huntley &
<i>closterium</i>	Redalje, 2006; Verma et al., 2010)
<i>Nitzschia</i>	(Griffiths & Harrison, 2009)
<i>communis</i>	
<i>Nitzschia</i>	(Griffiths & Harrison, 2009)
<i>dissipata</i>	
<i>Nitzschia</i>	(Ghasemi Y., 2012; Griffiths &
<i>frustulum</i>	Harrison, 2009; Verma et al., 2010)
<i>Nitzschia laevi</i>	(Li et al., 2008; Satyanarayana et al., 2011)
<i>Nitzschia palea</i>	(Griffiths & Harrison, 2009)
<i>Phaeodactylum</i>	(Ahmad et al., 2011; Amaro et
<i>tricornutum</i>	al., 2011; Beer et al., 2009; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Chisti, 2007;

		Courchesne et al., 2009; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Gong & Jiang, 2011; Griffiths & Harrison, 2009; Halim et al., 2012; Hempel et al., 2012; Huntley & Redalje, 2006; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
	<i>Skeletonema</i> sp.	(Chen et al., 2011; Rodolfi et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
	<i>Skeletonema dimorphus</i>	(Ghasemi Y., 2012)
	<i>Skeletonema costatum</i>	(Ahmad et al., 2011; Chen et al., 2011; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Griffiths & Harrison, 2009; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
	<i>Skeletonema quadricauda</i>	(Ghasemi Y., 2012)
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	(Ahmad et al., 2011; Chen et al., 2011; Courchesne et al., 2009; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Griffiths & Harrison, 2009; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	(Griffiths & Harrison, 2009)
Xanthophyceae	<i>Ellipsoidion</i> sp.	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Chen et al., 2011; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Gong & Jiang, 2011; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Singh & Gu, 2010;

		<i>Monodus subterraneus</i>	Varfolomeev & Wasserman, 2011) (Ahmad et al., 2011; Chen et al., 2011; Courchesne et al., 2009; Deng et al., 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Li et al., 2008; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010)
	Eustigmatophyceae	<i>Tribonema</i> sp. <i>Monallanthus salina</i>	(Griffiths & Harrison, 2009) (Chisti, 2007; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Mata et al., 2010; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
		<i>Nannochloropsis</i> sp.	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Chisti, 2007; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Gong & Jiang, 2011; Griffiths & Harrison, 2009; Halim et al., 2012; Huntley & Redalje, 2006; Lam & Lee, 2012; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
		<i>Nannochloropsis salina</i>	(Griffiths & Harrison, 2009; Lam & Lee, 2012)
		<i>Nannochloropsis oculata</i>	(Amaro et al., 2011; Chen et al., 2011; Deng et al., 2009; Gong & Jiang, 2011; Lam & Lee, 2012; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
	Thraustochytriaceae	<i>Schizochytrium</i> sp.	(Brennan & Owende, 2010; Chisti, 2007; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010)
Haptophyta	Prymnesiophyceae	<i>Hymenomonas carterae</i>	(Griffiths & Harrison, 2009)

	<i>Isochrysis</i> sp.	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Chen et al., 2011; Chisti, 2007; Deng et al., 2009; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Satyanarayana et al., 2011; Singh & Gu, 2010)
	<i>Isochrysis galbana</i>	(Amaro et al., 2011; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Griffiths & Harrison, 2009; Halim et al., 2012; Huntley & Redalje, 2006; Lam & Lee, 2012; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Satyanarayana et al., 2011; Varfolomeev & Wasserman, 2011; Verma et al., 2010)
	<i>Pleurochrysis carterae</i>	(Mata et al., 2010)
	<i>Prymnesium parvum</i>	(Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Griffiths & Harrison, 2009; Singh & Gu, 2010; Um & Kim, 2009)
Pavlovophyceae	<i>Pavlova lutheri</i>	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Chen et al., 2011; Deng et al., 2009; Ghasemi Y., 2012; Gong & Jiang, 2011; Griffiths & Harrison, 2009; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Singh & Gu, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011)
	<i>Pavlova salina</i>	(Ahmad et al., 2011; Amaro et al., 2011; Chen et al., 2011; Deng et al., 2009; Gong & Jiang, 2011; Griffiths & Harrison, 2009; Malcata, 2011; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Singh & Gu, 2010)

ANNEXE B

Table S1

Experimental results vs values predicted by each model of the photoautotrophic experiment. Data is the normalized mean fluorescence of cells at 575 ± 20 nm (FL2) after Log_{10} transformation.

Run	Response values (mean FL2)					
	SO	AC		CP		
	Actual value	Predicted value	Actual value	Predicted value	Actual value	Predicted value
8	-1.27	-1.17	-0.83	-0.85	0.29	0.33
12	-0.72	-0.90	-0.69	-0.64	0.53	0.43
16	-1.66	-1.72	-1.00	-0.96	0.29	0.28
17	-1.43	-1.45	-0.78	-0.76	0.34	0.38
19	-0.57	-0.52	-0.45	-0.39	-0.01	-0.04
4	-0.33	-0.26	-0.10	-0.19	0.06	0.06
3	-1.38	-1.37	-0.79	-0.87	0.27	0.28
7	-1.15	-1.10	-0.77	-0.67	0.34	0.38
10	-1.49	-1.68	-0.80	-0.75	0.19	0.18
15	-1.42	-1.41	-0.51	-0.55	0.25	0.28
13	-0.80	-0.84	-0.35	-0.35	0.07	0.15
5	-1.56	-1.53	-0.57	-0.65	0.35	0.28
1	-1.85	-1.69	-0.90	-0.98	0.54	0.58
9	-0.98	-1.15	-0.67	-0.66	0.40	0.38
20	-1.59	-1.54	-0.67	-0.65	0.32	0.33
18	-1.57	-1.54	-0.70	-0.65	0.41	0.33
14	-1.58	-1.54	-0.63	-0.65	0.35	0.33
11	-1.59	-1.54	-0.61	-0.65	0.39	0.33
6	-1.58	-1.54	-0.69	-0.65	0.37	0.33
2	-1.54	-1.54	-0.65	-0.65	0.18	0.33

Table S2

Experimental results vs values predicted by each model of the heterotrophic experiment. Data is the normalized mean fluorescence of cells at 575 ± 20 nm (FL2) after Log_{10} transformation.

Run	Response values (mean FL2)					
	SO	AC		CP		
	Actual value	Predicted value	Actual value	Predicted value	Actual value	Predicted value
8	-0.92	-0.88	-1.06	-1.03	0.41	0.44
12	-0.84	-0.78	-0.64	-0.75	0.71	0.65
16	-1.49	-1.52	-1.01	-1.03	0.29	0.20
17	-1.16	-1.17	-0.82	-0.75	0.41	0.41
19	-0.95	-1.01	-0.96	-1.03	0.09	0.10
4	-0.88	-0.91	-0.84	-0.75	0.31	0.31
3	-1.65	-1.65	-1.01	-1.03	0.25	0.22
7	-1.31	-1.30	-0.77	-0.75	0.46	0.44
10	-1.11	-1.08	-1.20	-1.03	0.27	0.37
15	-0.83	-0.89	-0.78	-0.75	0.49	0.59
13	-0.90	-0.90	-0.85	-0.89	0.35	0.37
5	-1.44	-1.41	-0.88	-0.89	0.18	0.32
1	-0.86	-0.92	-0.95	-0.89	0.55	0.57
9	-1.14	-1.05	-0.98	-0.89	0.44	0.39
20	-0.94	-0.99	-0.81	-0.89	0.47	0.48
18	-0.95	-0.99	-0.90	-0.89	0.53	0.48
14	-0.95	-0.99	-0.84	-0.89	0.43	0.48
11	-1.06	-0.99	-0.86	-0.89	0.48	0.48
6	-1.02	-0.99	-0.81	-0.89	0.59	0.48
2	-1.01	-0.99	-0.87	-0.89	0.56	0.48

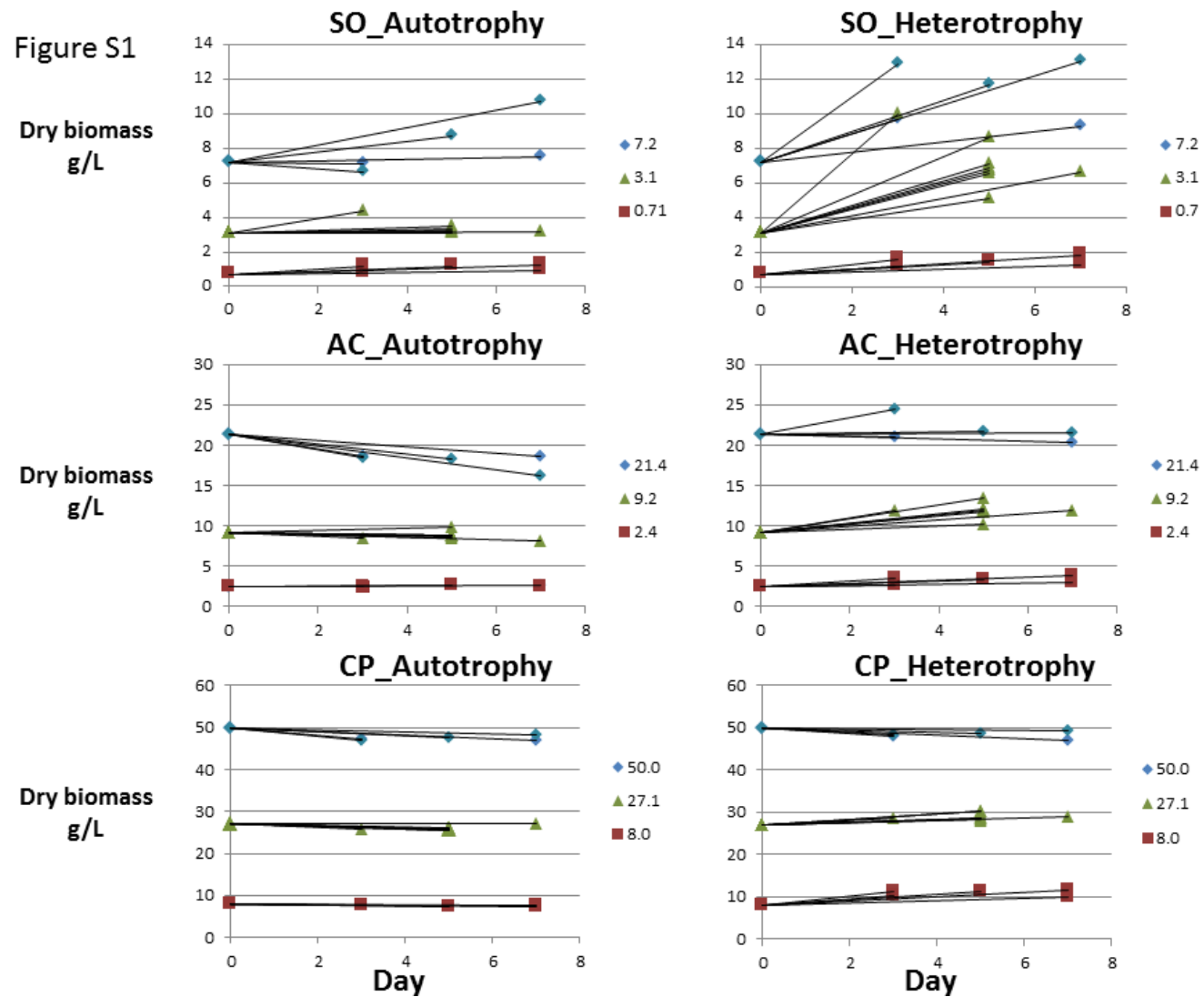


Figure S1. Monitoring of biomass densities of the samples during RSM experiments. (SO: *Scenedesmus obliquus*; AC: *Ankistrodesmus convolutus*; CP: *Chlorella protothecoides*).

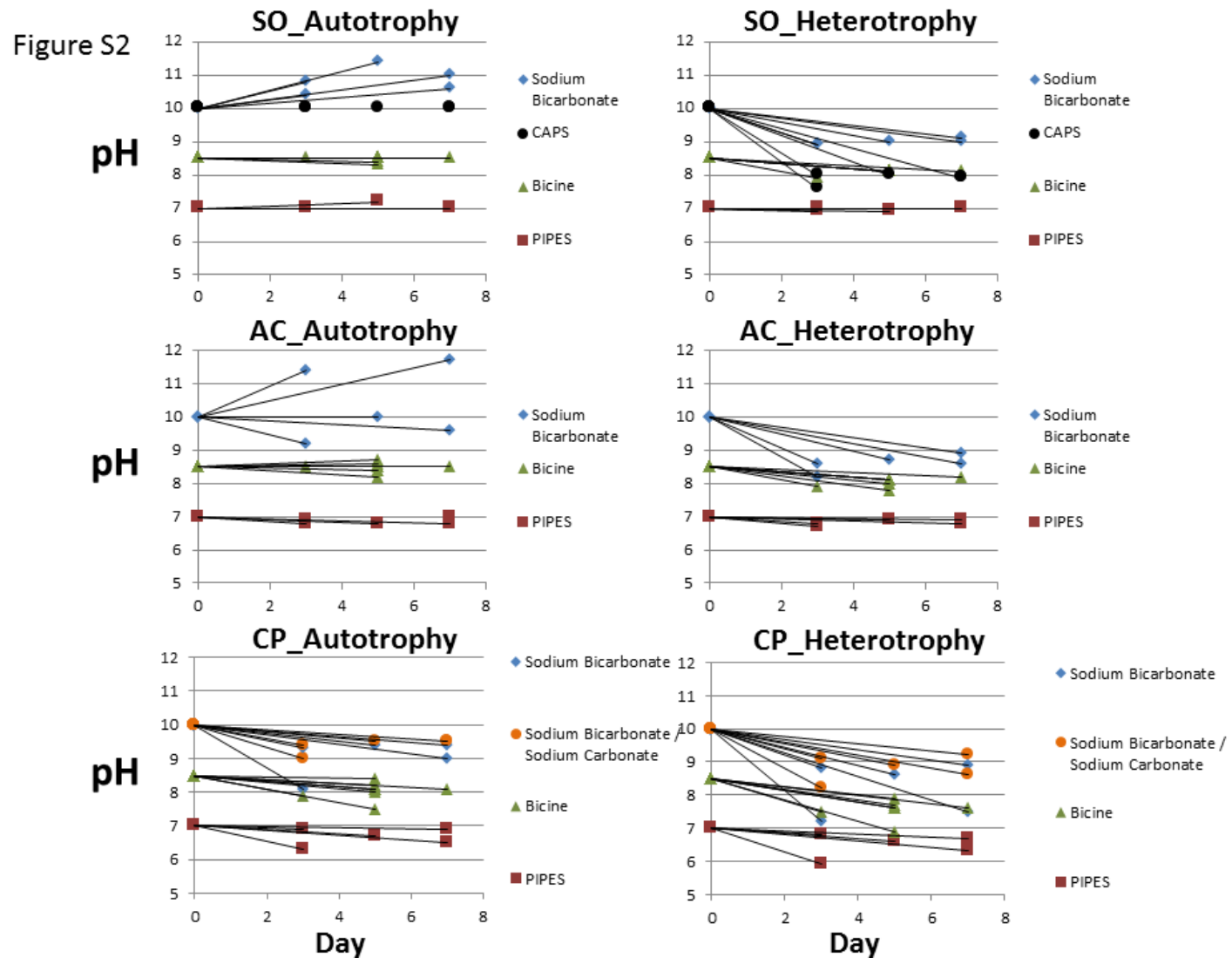


Figure S2. Monitoring of pH of the samples during RSM experiments. (SO: *Scenedesmus obliquus*; AC: *Ankistrodesmus convolutus*; CP: *Chlorella protothecoides*).